

Aus dem Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie
der Ludwig-Maximilians-Universität München
Vorstand: Prof. Dr. Thomas Gudermann

Liganden-abhängige Desensitisierung und pro-algetische Signalwege des hMrgX1-Rezeptors

Dissertation
zum Erwerb des Doktorgrades der Naturwissenschaften
an der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

vorgelegt von
Hans Jürgen Solinski
aus Hamburg

München, 2013

Gedruckt mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Ludwig-Maximilians-Universität München

Betreuerin: Prof. Dr. Ingrid Boekhoff

Zweitgutachterin: Prof. Dr. Martha Merrow

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. Maximilian Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 10.12.2013

Inhaltsverzeichnis

1 Zusammenfassung.....	1
2 Summary	3
3 Einleitung	5
3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren.....	5
3.1.1 Allgemeines	5
3.1.2 Struktur und Klassifizierung.....	6
3.1.3 Rezeptortheorie	8
3.1.4 G-Protein-Aktivierung durch GPCR	11
3.1.5 Signalwege von GPCR	13
3.1.5.1 $G_{s/olf}$ -abhängige Signaltransduktion.....	13
3.1.5.2 $G_{i/o}$ -abhängige Signaltransduktion.....	14
3.1.5.3 $G_{q/11}$ -abhängige Signaltransduktion.....	15
3.1.5.4 $G_{12/13}$ -abhängige Signaltransduktion	16
3.1.5.5 G-Protein-unabhängige Signaltransduktion.....	17
3.1.6 GPCR bei der Nozizeption	17
3.1.7 Regulation von GPCR durch anhaltende Ligandenstimulation.....	20
3.1.7.1 Allgemeine Abläufe.....	20
3.1.7.2 Entkopplung des GPCR vom kognaten G-Protein	21
3.1.7.3 Agonisten-vermittelte GPCR-Endozytose.....	22
3.1.7.4 GPCR-Degradation und -Resensitisierung	23
3.1.7.5 Bedeutung der Liganden-vermittelten GPCR-Regulation.....	24
3.2 Die Familie der Mrg-Rezeptoren	26
3.2.1 Allgemeines und Nomenklatur	26
3.2.2 Mitglieder der Mrg-Rezeptorfamilie	27
3.2.3 Liganden von Mrg-Rezeptoren	29
3.2.4 Zelluläre Signalwege von MrgC-Rezeptoren	30
3.2.5 Physiologische Funktionen von MrgC-Rezeptoren	31
3.3 Die Subfamilie der MrgX-Rezeptoren	34
3.3.1 Allgemeines und Mitglieder der MrgX-Subfamilie.....	34
3.3.2 Der hMrgX1-Rezeptor	36
3.3.2.1 Expressionsprofil des hMrgX1-Rezeptors.....	36
3.3.2.2 Liganden des hMrgX1-Rezeptors	37
3.3.2.3 Zelluläre Signalwege des hMrgX1-Rezeptors.....	38
3.3.2.4 Physiologische Funktionen des hMrgX1-Rezeptors	39
3.4 Zielsetzung der Arbeit.....	42

4 Material und Methoden	43
4.1 Material	43
4.1.1 Geräte	43
4.1.2 Verbrauchsmaterialien	44
4.1.3 Reagenzien	45
4.1.4 Antikörper	46
4.1.4.1 Primärantikörper (nicht konjugiert)	46
4.1.4.2 Primärantikörper (Allophycocyanin-konjugiert)	46
4.1.4.3 Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)	46
4.1.5 Molekularbiologie	46
4.1.6 Zellen und Nährmedien	47
4.1.7 Bakterien	48
4.1.8 Plasmide	49
4.1.8.1 Expressionskonstrukte von Mrg-Rezeptoren	49
4.1.8.2 Expressionskonstrukte des TRPV1-Ionenkanals	50
4.1.8.3 Reportergenkonstrukte	52
4.1.8.4 Weitere Vektoren	53
4.2 Methoden	54
4.2.1 Zellkultur	54
4.2.1.1 Kultivierung	54
4.2.1.2 Kryokonservierung	55
4.2.1.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen	55
4.2.1.4 Beschichtung von Loch-Platten zur Verbesserung der Zelladhärenz	55
4.2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen	56
4.2.1.5.1 Transfektion mit PromoFektin	56
4.2.1.5.2 Transfektion durch Elektroporation	57
4.2.1.6 Herstellung stabil-exprimierender Zelllinien	57
4.2.2 Molekularbiologische Methoden	59
4.2.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien	59
4.2.2.2 Bakterientransformation durch Hitzeschock	60
4.2.2.3 Quantitative Plasmidisolation	60
4.2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung	61
4.2.2.5 Restriktionsverdau	61
4.2.2.6 PCR	62
4.2.2.7 Ligation	63
4.2.2.8 Agarosegelelektrophorese	64
4.2.2.9 Präparative Plasmidisolation	65
4.2.3 Zellbiologische Methoden	65
4.2.3.1 Bestimmung der Oberflächenexpression von GPCR	65

Inhaltsverzeichnis

4.2.3.2	Bestimmung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen	68
4.2.3.2.1	Aequorin als molekularer Ca^{2+} -Detektor	68
4.2.3.2.2	Fura2 als molekularer Ca^{2+} -Detektor	69
4.2.3.3	Messung von Ionenkanalaktivität mittels Mn^{2+} -induziertem Fura2-Quenching	73
4.2.3.4	Messung der Phosphorylierung oder Expression von Protein	74
4.2.3.4.1	Herstellung von Proteinlysat	75
4.2.3.4.2	Polyacrylamidgelelektrophorese	75
4.2.3.4.3	Immunoblot	76
4.2.3.5	Quantitative PCR	78
4.2.3.6	Messung von transkriptioneller Regulation mit Reportergenkonstrukten	82
4.2.3.7	Bestimmung von CCL2 in Zellkulturüberständen	83
4.2.3.8	Elektrophysiologie	84
4.2.3.9	Bestimmung der zellulären cAMP-Akkumulation	87
4.2.3.10	Durchflusszytometrie	88
4.2.4	Statistische Methoden	91
5	Ergebnisse	93
5.1	Pharmakologischer Vergleich zwischen dem hMrgX1-Rezeptor und den MrgC-Rezeptoren von Maus und Ratte	93
5.1.1	Etablierung von hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen	93
5.1.2	Konzentration-Wirkungskurven nach Fura2-AM-Beladung in HEK293-Zellen	95
5.1.3	Konzentration-Wirkungskurven in Aequorin stabil-ko-exprimierenden HEK293-Zellklonen	99
5.1.4	Erk-1/2-Aktivierung durch hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren	102
5.1.5	Pharmakologie des hMrgX1-Rezeptors in F11-Zellen	104
5.2	Regulation von hMrgX1/MrgC-Rezeptoren durch permanente Ligandenstimulation	109
5.2.1	Spezies-spezifische Desensitisierung der Ca^{2+} -Signale von Mrg-Rezeptoren	109
5.2.2	Spezies-spezifische Liganden-induzierte Endozytose von Mrg-Rezeptoren in HEK293-Zellen	110
5.2.2.1	Liganden-induzierte Endozytose in Mrg-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellen	110
5.2.2.2	Liganden-induzierte Endozytose in Mrg-Rezeptor transient-exprimierenden HEK293-Zellen	112

Inhaltsverzeichnis

5.2.2.3	Liganden-induzierte Endozytose des rMrgC-Rezeptors in HEK293-rMrgC-Zellen.....	114
5.2.3	Spezies-spezifische Liganden-induzierte Endozytose von Mrg-Rezeptoren F11-Zellen.....	114
5.2.4	Spezies-spezifische Liganden-induzierte Endozytose von Mrg-Rezeptoren in ND-C-Zellen	117
5.2.5	Liganden-induzierte Endozytose des mMrgC-Rezeptors über β -Arrestine ..	118
5.3	Duale funktionelle Regulation des TRPV1 durch hMrgX1-Rezeptoren.....	120
5.3.1	Funktionelle Interaktion in HEK293-hMrgX1-TRPV1-Zellen.....	120
5.3.1.1	Etablierung der HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zelllinie	120
5.3.1.2	Aktivierung des TRPV1 durch BAM8-22	121
5.3.2	Sensitisierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor in F11-hMrgX1-Zellen	123
5.3.2.1	Etablierung des Zellmodells.....	123
5.3.2.2	Sensitisierung des TRPV1 in F11-hMrgX1-Zellen durch Bradykinin.....	125
5.3.2.3	PKC-abhängige Sensitisierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor	127
5.3.3	Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor in F11-hMrgX1-Zellen	129
5.3.3.1	Messung der direkten TRPV1-Aktivierung mittels Mn^{2+} -induziertem Fura2-Quenching.....	129
5.3.3.2	Messung der direkten TRPV1-Aktivierung mittels Ca^{2+} -Imaging	131
5.3.3.3	Messung der direkten TRPV1-Aktivierung mittels Elektrophysiologie	134
5.3.3.4	Fehlende Beteiligung etablierter TRPV1-modulierender Signalwege an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung.....	138
5.3.3.5	Bedeutung der PLC- β für die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung.....	140
5.3.3.6	Aktivierung des TRPV1 durch direkte DAG-Bindung in F11-hMrgX1-Zellen.....	142
5.3.3.7	TRPV1-Aktivierung durch hMrgX1-Rezeptoren über DAG-Produktion	147
5.3.3.8	TRPV1-Aktivierung durch hMrgX1-Rezeptoren über PIP ₂ -Abbau ...	148
5.3.3.9	TRPV1-Aktivierung durch hMrgX1-Rezeptoren über DAG-Produktion und PIP ₂ -Abbau.....	151
5.3.4	Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R.....	154
5.4	hMrgX1-Rezeptoren regulieren die Expression schmerz-relevanter Gene.....	160
5.4.1	Genregulation über die Serin/Threonin-Kinasen Erk-1/2	160
5.4.1.1	hMrgX1-vermittelte Aktivierung von Erk-1/2.....	160

Inhaltsverzeichnis

5.4.1.2	hMrgX1-vermittelte Aktivierung von Erk-1/2-abhängigen Reporter-genkonstrukten.....	162
5.4.1.3	Induktion TCF/Srf-abhängiger Gene durch hMrgX1-Rezeptoren in F11-hMrgX1-Zellen	166
5.4.1.4	TCF/Srf-abhängige Induktion von EGR-1 durch hMrgX1-Rezeptoren in transfizierten, primären Spinalganglienneuronen.....	169
5.4.2	Ca ²⁺ -abhängige Genregulation.....	172
5.4.2.1	hMrgX1-vermittelte Aktivierung eines NFAT-abhängigen Reporter-genkonstruktes in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen	172
5.4.2.2	Induktion NFAT-abhängiger Gene durch hMrgX1-Rezeptoren in F11-hMrgX1-Zellen	173
5.4.2.3	NFAT-abhängige Induktion von CCR2 durch hMrgX1-Rezeptoren in transfizierten, primären Spinalganglienneuronen.....	180
5.4.2.4	CCR2-Induktion wird in F11-hMrgX1-Zellen nicht durch Bradykinin vermittelt.....	181
5.4.3	Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten Genregulation	185
5.5	hMrgX1-vermittelte CCL2-Produktion in LAD2-Zellen	187
5.5.1	Funktionelle Proteinexpression des hMrgX1-Rezeptors in LAD2-Mastzellen	187
5.5.2	hMrgX1-vermittelte CCL2-Ausschüttung aus LAD2-Mastzellen	188
6	Diskussion	191
6.1	Zusammenfassung hMrgX1-vermittelter Signalwege	191
6.2	Pharmakologischer Vergleich von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren.....	194
6.3	Spezies-spezifische Endozytose innerhalb der BAM8-22-sensitiven Mrg-Rezeptoren	199
6.4	Duale Regulation des akut pro-algetisch wirkenden TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor	205
6.4.1	Sensitisierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor.....	206
6.4.2	Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor	207
6.4.3	Unterschiede zwischen hMrgX1-vermittelter Sensitisierung und Aktivierung des TRPV1.....	210
6.4.4	Unterschiede zwischen hMrgX1- und B2R-induzierter Aktivierung des TRPV1	212
6.5	hMrgX1-vermittelte Induktion schmerzrelevanter Gene	214
6.5.1	Aktivierung von Erk-1/2-abhängiger Transkription durch den hMrgX1-Rezeptor.....	216
6.5.2	Aktivierung von NFAT-abhängiger Transkription durch den hMrgX1-Rezeptor	218

Inhaltsverzeichnis

6.5.3 hMrgX1-vermittelte parakrine Interaktion von Nozizeptoren und Mastzellen	223
7 Literaturverzeichnis.....	225
8 Anhang	I
Abbildungsverzeichnis	I
Tabellenverzeichnis.....	VI
Abkürzungsverzeichnis	VII
Aminosäurenverzeichnis	X
Verzeichnis von Primersequenzen für die quantitative PCR	XI
Danksagung	XII

1 Zusammenfassung

Der humane *Mas-related gene X1* (hMrgX1)-Rezeptor ist ein G-Protein-gekoppelter Rezeptor, der selektiv in nozizeptiven Spinalganglienneuronen exprimiert wird. Eine spezifische Aktivierung des Rezeptors durch das Proenkephalin-Spaltprodukt BAM8-22 (*bovine adrenal medulla 8-22*) wird als schmerzhaft wahrgenommen. Damit stellt der hMrgX1-Rezeptor eine neue molekulare Zielstruktur für eine potentiell nebenwirkungsarme, analgetische Therapie dar. Trotz dieses Potentials sind die proalgetischen Signalwege des hMrgX1-Rezeptors bislang nicht verstanden.

Der MrgX1-Rezeptor entwickelte sich unter hohem positivem Selektionsdruck und kommt nur in Primaten vor. Trotzdem wurden die nicht-homologen MrgC-Rezeptoren der Nagetiere zur Analyse des hMrgX1-Rezeptors verwendet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zunächst vergleichende Ligandenprofile des hMrgX1- und der MrgC-Rezeptoren aus Maus und Ratte erstellt. Dabei wurden deutliche Unterschiede offensichtlich, da der hMrgX1-Rezeptor exklusiv von BAM8-22 aktiviert wurde, während die MrgC-Rezeptoren durch weitere Liganden, u. a. Spaltprodukte des Proopiomelanocortins, z. T. sogar effizienter aktiviert wurden. Zudem konnte gezeigt werden, dass die MrgC-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisation auf Grund einer β -Arrestin-abhängigen Rezeptorendozytose deutlich desensitisierte, während der hMrgX1-Rezeptor resistent gegenüber dieser Liganden-induzierten Regulation war. Daher können die MrgC-Rezeptoren der Nagetiere nicht als Modellsystem für den hMrgX1-Rezeptor verwendet werden, so dass in dieser Arbeit weiterführend Signalwege des hMrgX1-Rezeptors in Spinalganglienneuronen-ähnlichen F11-Zellen und primären Spinalganglienneuronen untersucht wurden.

Dabei zeigte sich eine duale funktionelle Regulation des etablierten proalgetischen TRPV1 (*transient receptor potential cation channel vanilloid 1*)-Ionenkanals. Zum einen sensitisierte der hMrgX1-Rezeptor den TRPV1 über einen etablierten, Proteinkinase C-abhängigen Signalweg. Zum anderen zeigte sich eine direkte hMrgX1-medierte Aktivierung des TRPV1. Dieser Regulationsmechanismus wurde durch eine Phospholipase C (PLC)- β -induzierte Produktion des endogenen TRPV1-Liganden Diacylglycerol und durch die Degradation des tonisch TRPV1-inhibierenden PLC- β -Substrates Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat vermittelt.

Neben der TRPV1-Modulation induzierte der hMrgX1-Rezeptor die Expression verschiedener Gene, deren zentrale Bedeutung bei der inflammatorischen und neuropathischen Schmerzchronifizierung etabliert ist. Einerseits wurde eine hMrgX1-induzierte Phosphorylierung der *extracellular signal-regulated kinases 1/2* beobachtet, die in einer Aktivierung von *serum response factor*-abhängigen Reportergenkonstrukten

und in der Induktion von c-Fos auf mRNA- und von *early growth response protein 1* auf mRNA- und Proteinebene resultierte. Andererseits zeigte sich die transkriptionelle Ca^{2+} /Calcineurin-abhängige Aktivierung des *nuclear factor of activated t cells*, die in der Induktion des CCR2 (*chemokine receptor 2*) auf mRNA- und Proteinebene resultierte. Somit konnte erstmalig ein physiologischer Induktor des CCR2 in Spinalganglienneuronen beschrieben werden. Weiterhin wurde nach der Etablierung der endogenen Proteinexpression des hMrgX1-Rezeptors in LAD2-Mastzellen eine BAM8-22-induzierte Freisetzung des CCR2-Agonisten *chemokine ligand 2* ermittelt, so dass der hMrgX1-Rezeptor die parakrine Stimulation von nozizeptiven Spinalganglienneuronen durch Mastzellen fördern könnte.

Diese Dissertation trägt somit zum besseren molekularen Verständnis akuter und chronischer pro-algetischer Funktionen des hMrgX1-Rezeptors bei und könnte damit die Entwicklung neuer analgetischer Wirkstoffe ermöglichen.

2 Summary

Human Mas-related gene X1 receptors (hMrgX1) are G protein-coupled receptors that are selectively expressed in nociceptive dorsal root ganglia (DRG) neurons. Specific activation of hMrgX1 by the proenkephalin cleavage product bovine adrenal medulla peptide 8-22 (BAM8-22) causes pain. Thus, hMrgX1 are considered a novel molecular analgesic target with the potential of less untoward effects. However, pro-algetic signaling pathways of hMrgX1 are not understood.

MrgX1 developed primate-specific under a strong positive selective pressure. Despite this, non-homologous MrgC receptors of rodents have been used to understand hMrgX1 functions. Therefore, ligand profiles of hMrgX1 and MrgC receptors of mice and rat were determined herein. The hMrgX1 was exclusively activated by BAM8-22 whereas further ligands, for instance cleavage products of proopiomelanocortin, stimulated MrgC receptors thus, pointing to distinct ligand profiles between hMrgX1 and MrgC receptors. Additionally, MrgC-induced Ca^{2+} signals desensitized due to β -arrestin-dependent receptor endocytosis while hMrgX1 were resistant to this ligand-induced process. Hence, MrgC receptors of rodents appear not be a suitable model system for hMrgX1 and therefore signaling pathways of hMrgX1 were analyzed in DRG neuron-derived F11 cells and primary DRG neurons.

Interestingly, the activity of the well-known pro-algetic ion channel TRPV1 (transient receptor potential cation channel vanilloid 1) was modulated in a dual fashion by hMrgX1. On the one hand hMrgX1 sensitized the TRPV1 via an established protein kinase C-dependent signaling pathway. On the other hand hMrgX1 initiated a direct activation of the TRPV1. This pathway relied on phospholipase C (PLC)- β -dependent production of the endogenous TRPV1 ligand diacylglycerol and on the degradation of the tonic TRPV1-inhibiting PLC- β substrate phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate.

In addition to TRPV1 modulation, hMrgX1 induced the expression of distinct genes that are centrally involved in the chronification of inflammatory and neuropathic pain. Firstly, hMrgX1 mediated a phosphorylation of extracellular signal-regulated kinases 1/2, leading to an activation of serum response factor-dependent reporter gene constructs and to an induction of c-Fos on the mRNA level and early growth response protein 1 on the mRNA and protein level. Secondly, the Ca^{2+} /calcineurin-dependent nuclear factor of activated T cells was activated by hMrgX1, resulting in an induction of chemokine receptor 2 (CCR2) on the mRNA and protein level. Hence, hMrgX1 are the first physiological inducer of CCR2 in DRG neurons. Moreover, endogenous protein expression of hMrgX1 in LAD2 mast cells was established and the release of the CCR2 agonist chemokine ligand 2 from these cells after BAM8-22 stimulation could be

Summary

measured, suggesting that hMrgX1 enhance paracrine stimulation of nociceptive DRG neurons by mast cells.

This dissertation assists to understand acute and chronic pro-algetic functions of hMrgX1 on the molecular level and might help to develop novel analgesic drugs.

3 Einleitung

3.1 G-Protein-gekoppelte Rezeptoren

3.1.1 Allgemeines

Indem Zellen ihre Umgebung analysieren und dort vorkommende Substanzen detektieren, ist die Interaktion von unterschiedlichen Zellen innerhalb eines Organismus bzw. die Interaktion des gesamten Organismus mit der Umwelt erst denkbar. Zu diesem Zweck entwickelten sich im Laufe der Evolution Rezeptorproteine, die sich durch eine hohe Affinität zu einer gegebenen Substanz auszeichnen und die durch deren Bindung in ihrer Konformation und damit Funktion moduliert werden. Viele Rezeptorproteine detektieren Substanzen, für die die Zellmembran eine Diffusionsbarriere darstellt, im extrazellulären Raum. Dieses Signal wird dann über eine Konformationsänderung des Rezeptorproteins in die Zelle transmittiert, um dort sekundäre Signalkaskaden zu aktivieren. Dies wird möglich, da solche Rezeptorproteine aus transmembranären α -helikalen Domänen aufgebaut sind, die die Zellmembran durchziehen und somit einen extrazellulären und einen intrazellulären Teil des Proteins verbinden.

Interessanterweise konnten Vertreter einer einzelnen Klasse membranständiger Rezeptorproteine als diejenigen Proteine identifiziert werden, die auf molekularer Ebene für die Wahrnehmung von Licht, Geruchs- und Geschmacksstoffen verantwortlich sind. Sie werden als G-Protein-gekoppelte Rezeptoren (*G protein-coupled receptors*, GPCR) bezeichnet und erhielten ihren Namen aufgrund eines intrazellulären Bindungspartners, der Gruppe der G-Proteine (G als Abkürzung von Guanosin-bindend). Mittlerweile ist klar, dass auch Hormone verschiedenster Stoffklassen, Neurotransmitter oder Lipide durch die GPCR detektiert werden können. Im post-genomischen Zeitalter sind zurzeit 807 humane GPCR in der GPCR-Datenbank (www.gpcr.org) gelistet, die aufgrund ihrer Sequenz aus allen 20234 humanen Proteinen der Proteindatenbank Swiss-Prot (www.uniprot.org) extrahiert wurden. Damit stellen die GPCR die größte Super-Familie an Rezeptorproteinen dar (Pierce, 2002) und sind außerdem der wichtigste Angriffspunkt für medikamentöse Therapien. Beispielsweise wird davon ausgegangen, dass GPCR über 30 % aller pharmakologischen Zielstrukturen ausmachen (Wise, 2004).

3.1.2 Struktur und Klassifizierung

1986 wurde die DNA-Sequenz des β -Adrenozeptors entschlüsselt (Dixon, 1986). Damit ergab sich die erste komplette Proteinsequenz eines GPCR und es wurde sofort klar, dass große Übereinstimmungen mit Rhodopsinen bestehen. Für das Bakteriorhodopsin wurde bereits diskutiert, dass es mit sieben hydrophoben, α -helikalen Domänen die Zellmembran durchspannt (Engelman, 1982), so dass diese Topologie auch für den β -Adrenozeptor postuliert wurde. Nach diesem Befund wurde auch der Name heptahelikale Rezeptoren für die GPCR geprägt. Im Jahr 2000 gelang es dann mittels Kristallographie, die erste Struktur eines GPCR, nämlich des Rhodopsins, auf atomarer Ebene zu liefern (Palczewski, 2000). Diese Struktur bestätigte schließlich die Annahme eines heptahelikalen Rezeptorproteins, dessen N-Terminus sich im extrazellulären Raum befindet, während der C-Terminus im Inneren der Zelle lokalisiert ist. Dabei sind die sieben transmembranären Domänen durch jeweils drei extra- und intrazelluläre Schleifen verbunden (Abbildung 3.1).

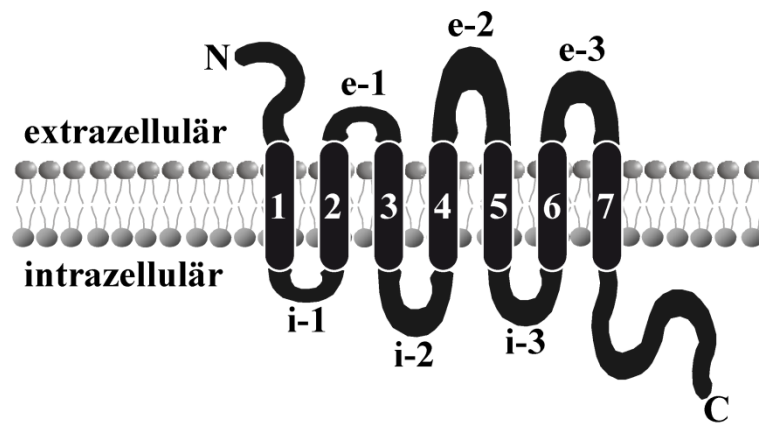


Abbildung 3.1: Schematische Darstellung der Domänen eines GPCR

Der N-Terminus im extrazellulären Raum bzw. C-Terminus im Zellinneren sind angegeben. Außerdem wurden die sieben transmembranären Domänen vom N-Terminus beginnend durchnummeriert. Ebenso wurde mit den jeweils drei intrazellulären (i-1 bis i-3) und extrazellulären (e-1 bis e-3) Schleifen verfahren.

Aufgrund von Sequenzhomologien und spezifischen strukturellen Eigenschaften, beispielsweise der Länge des N-Terminus, werden die GPCR in vier Familien eingeteilt (Foord, 2005). Die Familie 1 kann dabei noch in die drei Unterfamilien 1a bis 1c unterteilt werden, wofür vor allem Unterschiede in der Ligandenbindungsstelle verantwortlich sind (Bockaert, 1999). Eine Übersicht über diese Einteilung, zu Grunde liegende strukturelle Merkmale sowie einige vorkommende Liganden gibt Tabelle 3.1.

Mitglieder der sehr großen Familie 1a sind das Rhodopsin, verschiedene Catecholaminrezeptoren sowie die Ordorantrezeptoren, die im Riechepithel der Nase vorkommen [zur Übersicht (Bockaert, 1999)]. Die Ligandenbindung von Vertretern der Familie 1a erfolgt in einer Kavität zwischen den sieben transmembranären Domänen.

Einleitung

Die Familie 1b zeichnet sich, ebenso wie die Familie 1a, durch einen sehr kurzen N-Terminus aus und ist für die Erkennung von verschiedenen Peptidhormonen oder Chemokinen zuständig. Aufgrund der sterisch anspruchsvolleren Liganden erfolgt die Bindung zum Teil in der schon beschriebenen Kavität zwischen den transmembranären Domänen und zusätzlich im Bereich der extrazellulären Schleifen des GPCR (Trumpp-Kallmeyer, 1995). Die Gruppe 1c wird auch als Familie der Glykohormonrezeptoren bezeichnet und besitzt einen längeren N-Terminus als Vertreter der Gruppen 1a und b, mit dem auch das jeweilige Glykohormon gebunden wird (Fernandez, 1996, Ji, 1995). Alle Mitglieder der Familie 1 tragen typische, konservierte Aminosäuren, beispielsweise zwei Cysteine in den extrazellulären Schleifen eins und zwei, über die eine Disulfidbrücke ausgebildet wird (Schoneberg, 1999). Andere konservierte Regionen, z. B. das E/DRY-Motiv am Übergang der transmembranären Domäne drei zur intrazellulären Schleife zwei oder das NPxxY-Motiv in der transmembranären Domäne sieben, sollen eine Rolle bei der G-Protein-Aktivierung spielen (Mitchell, 1998).

Tabelle 3.1: Übersicht über die Klassifizierung von GPCR, deren Liganden und strukturelle Merkmale

Klassifizierung	Liganden	strukturelle Merkmale
Familie 1a	Retinal/Licht, Ordorantien, Catecholamine, Nukleotide, Adenosin, Opioide	kurzer N-Terminus; E/DRY- und NPxxY-Motiv; zwei Cysteine in extrazellulären Schleifen
Familie 1b	Peptide, Zytokine, Thrombin	
Familie 1c	FSH, TSH, LH	
Familie 2	Secretin, Glukagon, VIP, PTH, PACAP, Calcitonin, GHRH, GnRH	intermediärer N-Terminus; sechs Cysteine im N-Terminus
Familie 3	Glutamat, GABA, Geschmacksstoffe, Ca ²⁺ , Pheromone	sehr langer N-Terminus (Venus-Fliegenfalle)
Familie 4	<i>Wingless/Int-1, Hedgehog/Patched</i>	Cystein-reicher N-Terminus; geladene Aminosäuren am Anfang und Ende der dritten intrazellulären Schleife

Die Familie 2 ist eine kleinere Familie an GPCR und besitzt einen intermediären N-Terminus, mit dem der jeweilige Ligand gebunden wird. Als Liganden fungieren u. a. verschiedene Peptidhormone des Gastrointestinaltraktes, Calcitonin oder Parathormon (Laburthe, 1996). Interessanterweise ähneln sich die verschiedenen GPCR dieser Gruppe in ihrer Signaltransduktion (Pierce, 2002), da alle Vertreter hauptsächlich eine distinkte Klasse von G-Proteinen, die G_{s/olf} Proteine aktivieren (vgl. Abschnitt 3.1.5.1).

Die Familie 3 besitzt den längsten N-Terminus aller GPCR, der ähnlich einer Venus-Fliegenfalle aufgebaut ist und den Liganden bindet. Mitglieder sind die metabotropen Glutamatrezeptoren, der Gammaaminobuttersäure-B-Rezeptor sowie verschiedene Geschmacks- und Pheromonrezeptoren (Bockaert, 1999).

Die Familie 4 beinhaltet die *frizzled*-Rezeptoren und den *smoothened*-Rezeptor, welche in der embryonalen Entwicklung von großer Bedeutung sind und vor allem an der Ausbildung polarer Strukturen im gesamten Organismus bzw. innerhalb eines Gewebes beteiligt sind (Schulte, 2010).

3.1.3 Rezeptortheorie

Ursprünglich wurde das Massenwirkungsgesetz adaptiert, um die kinetischen Vorgänge bei der Interaktion von einem Rezeptor mit seinem Liganden zu beschreiben (Bergman, 1978, Tolkovsky, 1978). Nach diesem Modell wird die Bindung eines Liganden an seinen Rezeptor mit einer Geschwindigkeitskonstante beschrieben, so dass sich ein stabiler Ligand-Rezeptor-Komplex ausbildet. Dieses Modell war nur in der Lage die Interaktion von vollen Agonisten mit dem Rezeptorprotein zu erklären und wurde daher weiterentwickelt. Nachfolgend wurde vorgeschlagen (Kent, 1980, Williams, 1977), dass zwei Konformationen eines Rezeptorproteins existieren müssen, die als R und R* bezeichnet wurden. Zunächst wurde davon ausgegangen, dass beide Konformationen spontan nicht ineinander übergehen können und Agonisten sich durch eine höhere Affinität zu R* im Vergleich zu R auszeichnen, während Antagonisten R und R* mit gleicher Affinität binden können.

Eine weitere Verfeinerung dieses Modells wurde 1980 vorgeschlagen und als *ternary complex model* bezeichnet (De Lean, 1980). In diesem Modell wird der Beobachtung Rechnung getragen, dass die Gabe von Guanosintriphosphat (GTP) zu einem selektiven Verlust der hoch-affinen Bindungsstelle eines Agonisten führt. Der Name des Modells impliziert, dass eine dritte molekulare Komponente beteiligt ist, welche in einem Komplex mit dem Rezeptorprotein und dem Agonisten die aktive Rezeptoreinheit darstellt. Bereits kurz zuvor konnte gezeigt werden, dass die β -Adrenozeptor-vermittelte *cyclic adenosin monophosphate* (cAMP)-Produktion über ein intrazelluläres Protein vermittelt und dabei GTP verbraucht wird (Cassel, 1976, Ross, 1977a). Schließlich wurde klar, dass die dritte molekulare Komponente aus dem *ternary complex model* ein G-Protein und damit eine der primären Signaltransduktionskomponenten von GPCR darstellt. Im Rahmen des *ternary complex model* wurden erstmals Geschwindigkeitskonstanten definiert, um die Affinität und intrinsische Effizienz eines Agonisten zu beschreiben. Dabei wurde die Affinität eines Liganden zu seinem Rezeptor und damit die Geschwindigkeit der Bildung des Ligand-Rezeptor-Komplexes als K_D bezeichnet. Die intrinsische Effizienz eines Agonisten bezeichnete

die Fähigkeit, den Komplex aus Rezeptor und G-Protein zu stabilisieren, so dass im Prinzip eine zusätzliche, apparente Affinität definiert wurde, in der sich volle Agonisten (intrinsische Effizienz 1) und partielle Agonisten (intrinsische Effizienz < 1) unterscheiden. Antagonisten können im *ternary complex model* die gleiche Affinität zu einem Rezeptor zeigen, wie Agonisten. Da sie jedoch keine intrinsische Effizienz besitzen, binden sie den Rezeptor ohne G-Protein (R) ebenso affin wie den Rezeptor mit G-Protein (R*).

1993 wurde eine weitere Verfeinerung der Rezeptortheorie publiziert (Samama, 1993), die als *allosteric ternary complex model* bezeichnet wurde. Im Prinzip wird in diesem Modell zum einen von zwei spontan interkonvertierbaren Rezeptorkonformationen R und R* ausgegangen und zum anderen von der unabhängig davon ablaufenden Bindung von R* an das G-Protein. Die Bildung der aktiven Rezeptoreinheit kann also als zweistufiger Prozess verstanden werden. Das Vorhandensein von R* ohne G-Protein und R* mit G-Protein musste nach der Identifizierung konstitutiv-aktiver Rezeptormutanten postuliert werden, da nach Rekonstitution dieser Mutanten in künstlichen Lipidmembranen Agonisten trotz des Fehlens von G-Proteinen entsprechend ihrer intrinsischen Effizienz eine höhere Affinität zu den konstitutiv-aktiven Rezeptormutanten im Vergleich zu Wildtyp (WT) Rezeptoren aufwiesen. Im Prinzip sind durch die Verfeinerung des Modells zwei entscheidende Modifikationen eingeführt worden. Erstens wird die intrinsische Effizienz eines Agonisten nicht mehr nur durch eine höhere Affinität zum Rezeptor-G-Protein-Komplex beschrieben, sondern zusätzlich durch eine höhere Affinität zu R* gegenüber R. Genauer gesagt macht das Produkt beider Affinitäten die intrinsische Effizienz eines Liganden aus. Durch das Auftreten konstitutiv-aktiver Rezeptormutanten wurde sodann auch evident, dass inverse Agonisten existieren, welche sich durch eine höhere Affinität zu R gegenüber R* auszeichnen und demnach zwischen R* und dem R*-G-Protein-Komplex nicht diskriminieren. Solchen inversen Agonisten wird eine intrinsische Effizienz < 0 zugeordnet. Zweitens schlägt das *allosteric ternary complex model* zwei mechanistische Gründe für eine basale Rezeptoraktivität vor, die vermehrte Interaktion von R* mit dem G-Protein sowie eine Veränderung des Gleichgewichtes zwischen R und R* in Richtung von R*. Mechanistisch fand man heraus, dass die aktive und Agonist-gebundene Rezeptorkonformation R* von einem Guaninnukleotid-freien G-Protein stabilisiert wird. Dieser Zustand konnte kürzlich mittels einer sehr eleganten Kristallisationsstrategie auf atomarer Ebene dargestellt werden (Rasmussen, 2011).

Die Wirkung von verschiedenen Liganden auf ein Rezeptorprotein hängt also von ihrer Affinität und intrinsischen Effizienz ab. Letztere wirkt sich dabei auf die Signalweiterleitung des Rezeptors aus. Wird die Aktivierung eines solchen Signalweges, d. h. die Wirkung eines Liganden in Abhängigkeit von der Liganden-

konzentration gemessen, dann dient die Konzentration mit halb-maximaler Wirkung (EC_{50}) als Maß für die Potenz eines Liganden. Aufgrund der Rezeptorreserve kann dieser EC_{50} -Wert gegenüber der Affinität K_D nach links verschoben sein (Ariens, 1966).

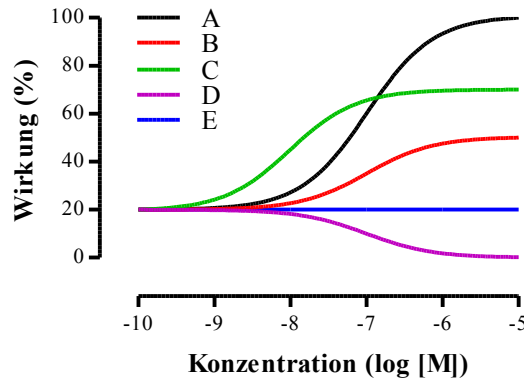


Abbildung 3.2: Theoretische Konzentration-Wirkungskurven verschiedener Liganden

Die Wirkung von verschiedenen Liganden auf die Signalweiterleitung eines fiktiven GPCR wurde ermittelt. Der GPCR wurde mit den Liganden A - E mit den angegebenen Konzentrationen stimuliert. Die Angabe wichtiger Kennziffern für die fünf Liganden findet sich in Tabelle 3.2.

Theoretische Konzentration-Wirkungskurven eines vollen Agonisten (A), partieller Agonisten unterschiedlicher Potenz und intrinsischer Effizienz (B und C), eines inversen Agonisten (D) und eines neutralen Antagonisten (E) sind in Abbildung 3.2 dargestellt. Aus diesen Kurven wurden sodann Potenz und intrinsische Effizienz berechnet und in Tabelle 3.2 zusammenfassend wiedergegeben.

Tabelle 3.2: Auswertung der Konzentration-Wirkungskurven aus Abbildung 3.2

Ligand	Potenz (EC_{50})	intrinsische Effizienz	Klassifizierung
A	100 nM	1	voller Agonist
B	100 nM	0,375	partieller Agonist
C	10 nM	0,625	partieller Agonist
D	10 nM	0	Antagonist
E	100 nM	-1	inverser Agonist

Durch die Etablierung neuer Methoden zur Analyse von multiplen Signaltransduktionsprozessen eines GPCR, die parallel von einem aktiven Rezeptor aktiviert werden können, wurde schließlich das Konzept des *biased agonism* (auch *functional selectivity* oder *collateral efficacy*) entwickelt (Kenakin, 1995). In diesem Konzept wird ein Rezeptorprotein nicht mehr als relativ statische Einheit angesehen, die zwischen zwei distinkten Konformationen hin und her wechselt. Vielmehr geht man von einem gesamten Ensemble an möglichen Rezeptorkonformationen aus. Einzelne Konformationen werden von verschiedenen Liganden unterschiedlich gut gebunden, was wiederum in einer Aktivierung von unterschiedlichen, intrazellulären Signaltrans-

duktionskomponenten mit distinkter Effizienz resultiert (Kenakin, 2011, Kenakin, 2010, Vaidehi, 2010). Beispiele für *biased agonists* sind der β -Blocker Carvedilol (Azzi, 2003), der Angiotensin-2-Rezeptor-Agonist [Sarcosin¹,I⁴,I⁸]-Angiotensin II (Wei, 2003) oder der Parathormonrezeptor-Agonist [d-W¹²,Y³⁴]-Parathormon 7-34 (Gesty-Palmer, 2009). Möglicherweise wird zukünftig die distinkte Signaltransduktion durch solche Liganden erfolgreich in der Medizin eingesetzt werden können (Kenakin, 2011).

3.1.4 G-Protein-Aktivierung durch GPCR

Die G-Protein-Aktivierung durch einen GPCR wird im sog. G-Protein-Zyklus beschrieben (Abbildung 3.3). Der Name G-Protein bezeichnet dabei einen heterotrimeren Komplex aus je einer α -, β - und γ -Untereinheit (Gilman, 1987). Das menschliche Genom kodiert für 16 α -, fünf β - und zwölf γ -Untereinheiten (Pierce, 2002), wobei β - und γ -Untereinheit eine stabile Einheit bilden, es wird hier vom $\beta\gamma$ -Komplex gesprochen. Sowohl α -Untereinheit als auch $\beta\gamma$ -Komplex sind jeweils durch Lipidanker an der inneren Seite der Zellmembran verankert. Alle α -Untereinheiten sind in der Lage, verschieden phosphorylierte Guaninnukleotide zu binden. Unter basalen Bedingungen liegt die α -Untereinheit in ihrer Guaninnukleotiddiphosphat (GDP)-gebundenen Form vor und ist mit dem $\beta\gamma$ -Komplex assoziiert. Ein GPCR wirkt nun als Guaninnukleotidaustauschfaktor (*guanine nucleotide exchange factor*, GEF) und vermittelt die Dissoziation von GDP. Ohne Guaninnukleotid bindet der aktivierte Rezeptor fest an das G-Protein (Rasmussen, 2011). Die Bindung von GTP an die α -Untereinheit des G-Proteins führt nun zur Dissoziation des gesamten Komplexes, nicht nur des heterotrimeren G-Proteins vom aktivierten Rezeptor, sondern auch der α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex. So sind zwei Signaltransduktionskomponenten entstanden, die separat von einander, partiell jedoch auch überlappend (vgl. Abschnitte 3.1.5.1 und 3.1.5.2), Signaltransduktionsprozesse modulieren können, um das Signal des aktivierten Rezeptors weiterzutragen. Schließlich kommt es zur hydrolytischen Abspaltung des terminalen Phosphatrestes vom GTP durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit, ein Prozess, der u. a. durch die *regulators of g protein signaling* (RGS)-Proteinfamilie, welche mit anderen Proteinen zu den GTPase-aktivierenden Proteinen (GAP) zusammengefasst wird, beschleunigt wird (Berman, 1996, Lambert, 2010). Die α -Untereinheit und der $\beta\gamma$ -Komplex reassoziieren zum heterotrimere G-Protein, das damit erneut aktiviert werden kann.

Möglicherweise ist der beschriebene Zyklus aus Dissoziation der α -Untereinheit vom und Reassoziation mit dem $\beta\gamma$ -Komplex nicht immer in dieser Weise realisiert. So wurde für einige α -Untereinheiten der $G_{i/o}$ -Klasse und deren $\beta\gamma$ -Komplexe mittels Förster-Resonanz-Energietransfer ermittelt, dass nach deren Aktivierung keine Dissoziation, sondern vielmehr eine Konformationsänderung des gesamten Komplexes

stattfindet, die die nachfolgende Interaktion mit Zielstrukturen ermöglicht (Bunemann, 2003, Frank, 2005).

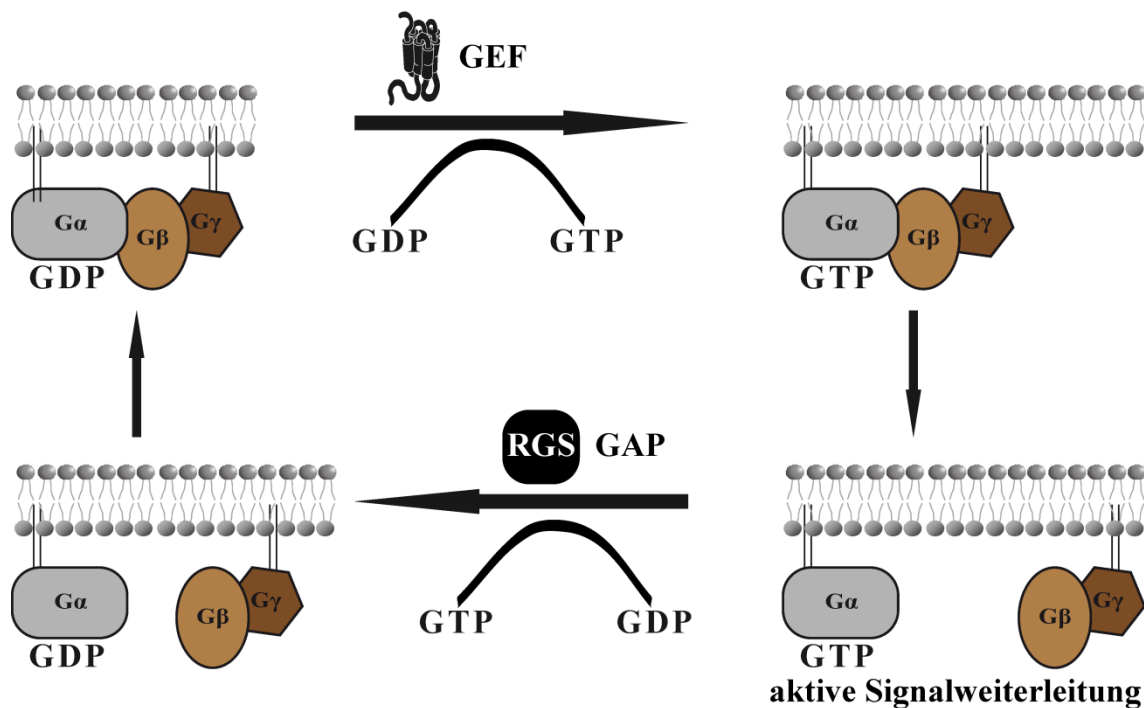


Abbildung 3.3: Schematische Darstellung des G-Protein-Zyklus

Im inaktiven Zustand liegt ein heterotrimerer Komplex aus α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Komplex vor, bei dem GDP an die α -Untereinheit gebunden ist. Ein GPCR wirkt nun als GEF und stimuliert den Austausch von GDP zu GTP an der α -Untereinheit, was wiederum zur Dissoziation der α -Untereinheit vom $\beta\gamma$ -Komplex führt. In diesem Zustand kommt es zur aktiven Signalweiterleitung durch α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Komplex. Schließlich wird durch die GTPase-Aktivität der α -Untereinheit das GTP zu GDP und Phosphat hydrolysiert. Dieser Prozess wird durch GAP, z. B. RGS-Proteine, beschleunigt und resultiert in der Reassoziierung des heterotrimeren Komplexes aus α -Untereinheit und $\beta\gamma$ -Komplex.

Die α -Untereinheiten von G-Proteinen werden in vier verschiedene Klassen eingeteilt: $G_{s/olf}$, $G_{i/o}$, $G_{q/11}$ und $G_{12/13}$. Verschiedene GPCR aktivieren präferentiell je eine Klasse von G-Proteinen, allerdings sind auch GPCR, beispielsweise der *thyroidea-stimulating hormone*-Rezeptor, bekannt (Laugwitz, 1996), die an alle vier G-Protein-Klassen koppeln können, so dass es im Einzelfall häufig nicht einfach ist, die Modulation einer bestimmten Signaltransduktionskomponente einer gewissen G-Protein-Klasse zuzuordnen. Im Folgenden sollen die grundlegenden Signaltransduktionswege von GPCR, unterteilt nach einer Beteiligung der jeweiligen G-Protein-Klasse, zusammengefasst werden. Außerdem ist kürzlich entdeckt worden, dass GPCR auch G-Protein-unabhängig Signale weiterleiten können. Dabei stellte sich in besonderer Weise eine Beteiligung von G-Protein-gekoppelten Rezeptorkinasen (GRK) und β -Arrestinen heraus (Lefkowitz, 2005, Luttrell, 1999, Terrillon, 2004).

3.1.5 Signalwege von GPCR

3.1.5.1 $G_{s/olf}$ -abhängige Signaltransduktion

1977 gelang die Isolation des G_s Proteins, das aufgrund seiner stimulatorischen Eigenschaften auf die Aktivität von Adenylylzyklasen (*adenylate cyclase*, AC) seinen Namen erhielt (Ross, 1977b). Zwölf Jahre später wurde ein weiterer Vertreter dieser G_α -Klasse, der ebenso zur AC-Stimulation in der Lage war, kloniert und aufgrund der selektiven Expression im Riechepithel als G_{olf} bezeichnet (Jones, 1989).

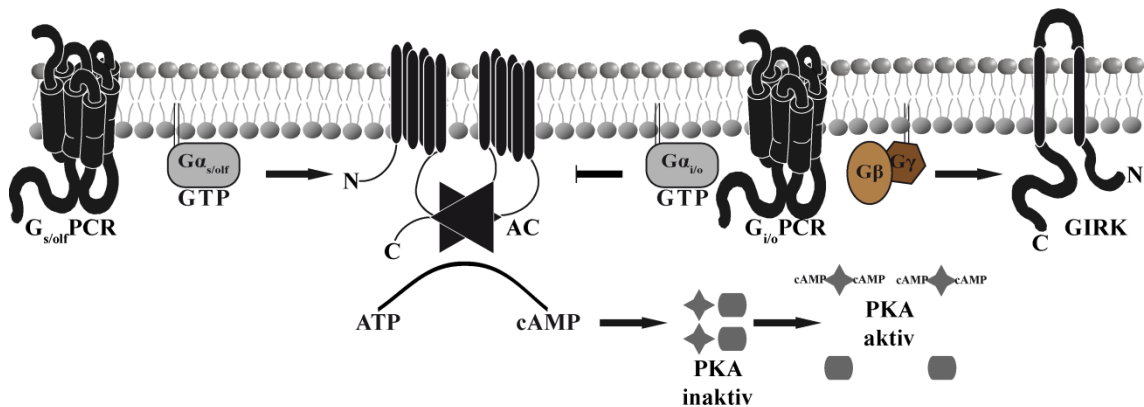


Abbildung 3.4: Schematische Darstellung von $G_{s/olf}$ - und $G_{i/o}$ -abhängiger Signaltransduktion

$G_{s/olf}$ -koppelnde GPCR aktivieren über die $G_{\alpha_{s/olf}}$ -Untereinheit AC. Diesem Prozess wirkt die aktivierte $G_{\alpha_{i/o}}$ -Untereinheit entgegen. AC katalysieren die Bildung von cAMP aus ATP, welches wiederum die PKA aktiviert. $G_{i/o}$ -koppelnde GPCR können über den $\beta\gamma$ -Komplex weitere Zielstrukturen modulieren, beispielsweise GIRK-Kanäle.

Die neun verschiedenen AC-Isoformen sind sehr große Proteine mit mehr als 1000 Aminosäuren, die aus zwei Domänen mit sechs transmembranären α -Helices und zwei zytoplasmatischen, globulären Domänen, die das katalytische Zentrum ausmachen, aufgebaut sind (Simonds, 1999). Die $G_{\alpha_{s/olf}}$ -Untereinheit stimuliert durch Bindung an die AC deren katalytische Aktivität (Abbildung 3.4), die in einer erhöhten Produktion von cAMP resultiert. cAMP fungiert nun als sekundärer Botenstoff, der durch Bindung die Funktion verschiedener Proteine modulieren kann: So wird eine distinkte Gruppe von Ionenkanälen, die CNG-Kanäle (*cyclic nucleotide gated*), das Rap-1-GEF Epac (*exchange factor directly activated by cAMP*) und die Proteinkinase A (PKA) aktiviert (Neves, 2002). Die PKA liegt unter basalen Bedingungen als Heterotetramer vor, das aus zwei katalytischen sowie zwei regulatorischen Untereinheiten besteht. Die Bindung von jeweils zwei cAMP-Molekülen an die regulatorischen Untereinheiten resultiert in einer Dissoziation des Komplexes, dessen katalytische Untereinheiten nun als Kinase verschiedene Zielstrukturen durch Phosphorylierung beeinflussen können (Abbildung 3.4). Beispiele solcher Zielstrukturen sind der Transkriptionsfaktor *cAMP response element binding protein* (CREB) oder Cav1-Kanäle in Kardiomyozyten (Neves, 2002).

3.1.5.2 $G_{i/o}$ -abhängige Signaltransduktion

Anfang der 1980er Jahre wurde ermittelt, dass die hormonell vermittelte Inhibition von AC über ein distinktes G-Protein abläuft, welches Analog zu G_s als G_i (*inhibitory*) bezeichnet wurde. Dieses Protein wurde in der Gruppe von Gilman erstmals isoliert (Bokoch, 1984, Katada, 1984a, Katada, 1984b, Katada, 1984c). Dabei konnte gezeigt werden, dass es spezifisch durch ein Toxin aus *Bordetella pertussis* an seinem C-Terminus ADP-ribosyliert und dadurch inhibiert wird (Bokoch, 1983). Im Unterschied dazu inhibiert die anhaltende Gabe von *Cholera*-Toxin $G_{s/olf}$ Proteine, diese inhibitorische Aktivität wird auf mechanistischer Ebene ebenso über eine ADP-Ribosylierung vermittelt (Kahn, 1984a, Kahn, 1984b). Ebenso wie bei der $G_{s/olf}$ -Klasse wird die primäre Funktion der $G_{i/o}$ -Klasse, die Inhibition der AC, durch die α -Untereinheit vermittelt (Abbildung 3.4).

Zusätzlich zu Effekten der α -Untereinheit sind gerade für $G_{i/o}$ Proteine eine Mehrzahl an Zielstrukturen des $\beta\gamma$ -Komplexes beschrieben worden. Als erstes wurde evident, dass auch $\beta\gamma$ -Komplexe in der Lage sind, spezifische AC-Isoformen in ihrer Aktivität zu modulieren. Beispielsweise wird die AC-1 durch $\beta\gamma$ -Komplexe inhibiert, während die AC-2 aktiviert wird (Taussig, 1993). Weitere $\beta\gamma$ -Zielstrukturen stellen verschiedene Ionenkanäle dar. So wurde die $G\beta\gamma_{i/o}$ -vermittelte Aktivierung von GIRK-Kanälen (*G protein-activated inward rectifying K^+ channels*) beobachtet (Breitwieser, 1985, Pfaffinger, 1985). Außerdem konnte die Inhibition von Ca_v2 -Kanälen in der Präsynapse durch die Verdrängung der aktivierenden β -Untereinheit des Kanalkomplexes als inhibitorischer Mechanismus von $G_{i/o}$ -koppelnden GPCR identifiziert werden (Qin, 1997). Schließlich wurde die Aktivierung distinkter Isoformen der Phospholipase C- β (PLC- β) beschrieben (Abbildung 3.5). Dabei erkannte man, dass die Isoformen 2 und 3 am stärksten, die PLC- β 1 zumindest noch leicht und die PLC- β 4 nicht durch $\beta\gamma$ -Komplexe aktiviert werden (Camps, 1992, Lee, 1994). PLC- β -Isoformen sind lösliche Enzyme, die an die Zellmembran rekrutiert werden und dort Phosphatidylinositol-4,5-bisphosphat (PIP_2) in Diacylglycerol (DAG) und Inositol-3,4,5-trisphosphat (IP_3) spalten (Rhee, 2001). IP_3 als hydrophiles Molekül ist sodann in der Lage, an IP_3 -Rezeptoren (IP_3R) des endoplasmatischen Retikulums (ER) zu binden. Diese stellen Liganden-operierte Ca^{2+} -Kanäle dar und werden durch IP_3 aktiviert. Da die Ca^{2+} -Konzentration im ER deutlich höher ist als im Zytoplasma, kommt es somit durch die Aktivität der PLC- β zu einem Anstieg der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration, was wiederum die Aktivität verschiedener Zielstrukturen, u. a. über die Bindung von Ca^{2+} -beladenem Calmodulin, moduliert (Chin, 2000).

Die Regulation von GRK durch $G_{\beta\gamma}$ -Komplexe wird in Abschnitt 3.1.7.2 beschrieben.

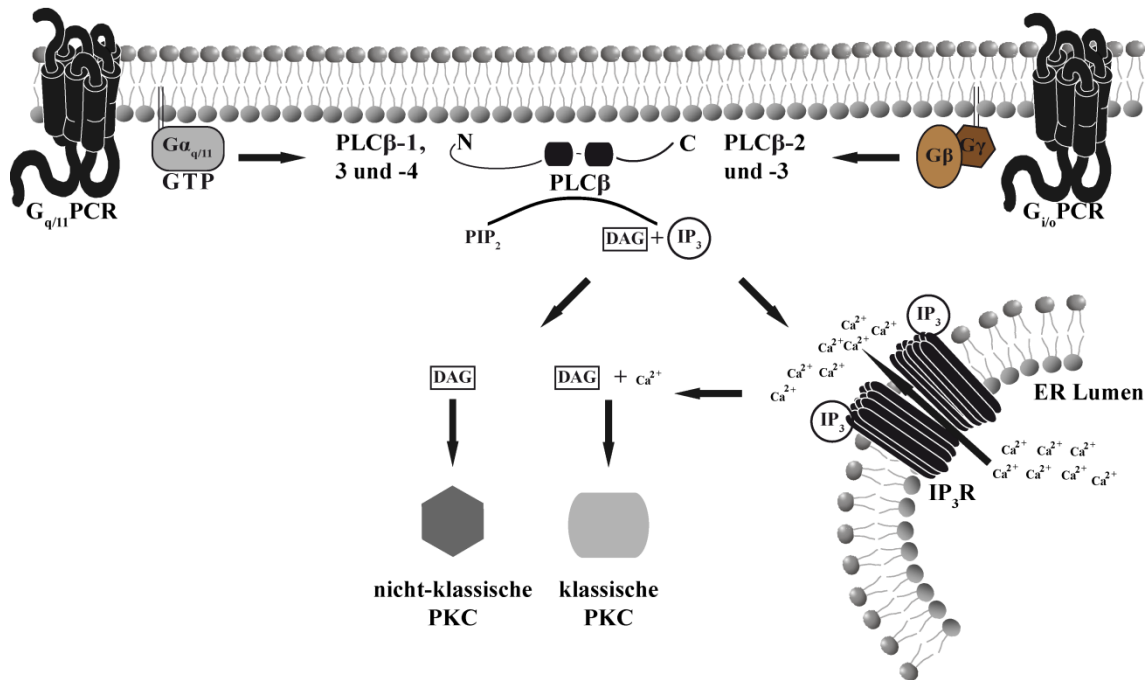


Abbildung 3.5: Schematische Darstellung G_{q/11}- und Gβγ_{i/o}-abhängiger Signaltransduktion

G_{q/11}-koppelnde GPCR aktivieren über die α-Untereinheit die PLC-β-Isoformen 1, 3 und 4, während G_{i/o}-koppelnde GPCR über ihren βγ-Komplex die PLC-β-Isoformen 2 und 3 aktivieren. Die PLC-β katalysiert die Bildung von DAG und IP₃ aus PIP₂. IP₃ aktiviert ER-ständige IP₃R, durch die Ca²⁺-Ionen ins Zytoplasma einströmen. DAG oder DAG in Kombination mit Ca²⁺-Ionen aktiviert sodann distinkte Subgruppen der PKC-Familie.

3.1.5.3 G_{q/11}-abhängige Signaltransduktion

Nach Befunden einer *Pertussis-Toxin* (PTX)-unabhängigen Erhöhung intrazellulärer Ca²⁺-Konzentrationen wurde die Existenz von weiteren G-Proteinen beschrieben (Strathmann, 1989). Durch die Rekonstitution der Gα_q-Untereinheit mit verschiedenen PLC-β-Isoformen konnte die direkte Aktivierung der PLC-β1 durch eine α-Untereinheit der neuen G_{q/11}-Klasse nachgewiesen werden (Taylor, 1991, Smrcka, 1991). Nachdem die weiteren drei PLC-β-Isoformen kloniert wurden, zeigte sich, dass α-Untereinheiten der neuen G_{q/11}-Klasse die PLC-β1, 3 und 4 aktivieren können, während die PLC-β2 nicht aktiviert wird (Jhon, 1993, Lee, 1994).

Die aktivierte PLC-β spaltet PIP₂ in DAG und IP₃ (vgl. Abschnitt 3.1.5.2). IP₃ bindet sodann an IP₃R des ER und führt zur Erhöhung der zytoplasmatischen Ca²⁺-Konzentration. Dies wiederum kann die Aktivität verschiedener Calmodulin-abhängiger Proteine modulieren, aber auch über C2-Domänen direkt die Aktivität beispielsweise der Proteinkinase C (PKC) beeinflussen (Abbildung 3.5). Die humane Familie der PKC besteht aus zwölf Isoformen, die aufgrund von Sequenzhomologien, aber auch aufgrund ihres Aktivierungsmechanismus in drei Subgruppen eingeteilt werden: Klassische, nicht-klassische oder neue und atypische Isoformen (Toker, 1998). Die klassischen Isoformen PKC-α, -β und -γ werden synergistisch durch die Bindung von DAG,

Phosphatylserin (PS) und Ca^{2+} -Ionen an drei distinkte Domänen aktiviert. Die nicht-klassischen oder neuen Isoformen PKC- δ , - ϵ , - η und - θ werden hingegen nicht mehr durch Ca^{2+} -Ionen, sondern nur noch durch DAG und PS aktiviert, während die atypischen Isoformen PKC- ζ und - λ nur durch PS aktiviert werden. Alle PKC-Isoformen phosphorylieren nach ihrer Aktivierung verschiedene Zielstrukturen an Serinen oder Threoninen, wobei zwei, vier und sechs Aminosäuren vor dem Phosphatakzeptor eine basische Aminosäure vorkommen muss. Zwei, drei und vier Aminosäuren danach begünstigen basische Aminosäuren die Aktivität klassischer PKC-Isoformen bzw. hydrophobe Aminosäuren jene der anderen PKC-Subgruppen (Toker, 1998).

3.1.5.4 $\text{G}_{12/13}$ -abhängige Signaltransduktion

Die Identität der α -Untereinheiten der $\text{G}_{12/13}$ -Klasse wurde 1991 auf mRNA-Ebene ermittelt (Strathmann, 1991). Trotzdem konnten zunächst nur wenige konkrete Signaltransduktionswege zugeordnet werden, da GPCR, die nur an $\text{G}_{12/13}$ -Proteine koppeln, unbekannt waren. Daher wurden die ersten Arbeiten mit GTPase-defizienten $\text{G}_{12/13}$ -Mutanten durchgeführt (Dhanasekaran, 1996). Als wichtigste Funktion zeigte sich die Modulation des Aktinzytoskelettes, indem die Aktivität des monomeren G-Proteins RhoA erhöht wurde (Buhl, 1995). Die Aktivierung von $\text{G}_{12/13}$ -Proteinen resultierte in der Bildung von Aktinstressfasern und von fokalen Adhäsionsplaques in 3T3-Fibroblasten. Dieser neue Signaltransduktionsweg konnte in den folgenden Jahren genauer aufgeschlüsselt werden, indem eine neue Gruppe von Rho-GEFs bekannt wurde, die eine Domäne mit hoher Ähnlichkeit zur RGS-Proteinfamilie besitzt. In der Tat konnte dann gezeigt werden, dass die Vertreter p150-Rho-GEF, PDZ-Rho-GEF und LARG durch die Bindung der α -Untereinheit von G_{12} bzw. G_{13} aktiviert werden und wiederum die Bildung von GTP-gebundenem, aktiven RhoA fördern (Fukuhara, 1999, Hart, 1998, Kozasa, 1998, Suzuki, 2003). RhoA-GTP kann nun über zwei unterschiedliche, synergistisch wirkende Signalwege zur Bildung von Stressfasern führen (Toksoz, 2002). Über die Rho-Kinase kommt es indirekt zu einer Akkumulation von phosphoryliertem Myosin, so dass die Aktin-Myosin-Interaktion und damit die Spannung des Aktinzytoskelettes erhöht wird. Außerdem wird über Proteine der Dia-Familie die Aktinpolymerisation über Profilin direkt stimuliert. Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass die Induktion der Aktinpolymerisation über die Freisetzung des globulären Aktinbindpartners *megakaryoblastic leukemia 1* zur Aktivierung von *serum response factor* (Srf)-abhängiger Transkription führt (Miralles, 2003), so dass durch die Aufdeckung dieses Signaltransduktionsweges eine gute Erklärung für die transformierende Wirkung von $\text{G}_{12/13}$ -abhängiger Signaltransduktion geliefert werden konnte (Dhanasekaran, 1996).

3.1.5.5 G-Protein-unabhängige Signaltransduktion

Obwohl über viele Jahre als unumstößliches Paradigma galt, dass GPCR die intrazelluläre Signaltransduktion über G-Proteine vermitteln, entstanden in den letzten 15 Jahren vermehrt Befunde, die eine G-Protein-unabhängige Signaltransduktion eines GPCR beschreiben. Dabei zeigte sich, dass die direkte Bindung an einen GPCR über SH2-, PDZ- oder prolinreiche Domänen abläuft und damit Bindungspartner verschiedener Klassen, im Falle der metabotropen Glutamatrezeptoren beispielsweise Isoformen der Homer-Familie, an den GPCR rekrutiert werden (Hall, 1999). Die am besten untersuchte Gruppe an neuen GPCR-Bindungspartnern, die G-Protein-unabhängig zur Signaltransduktion beitragen können, stellen jedoch die GRK und die β -Arrestine dar. So wurde evident, dass die Aktivität von GRK und die Rekrutierung von β -Arrestinen zum aktivierten β 1-Adrenozeptor notwendig ist, um die Tyrosinkinase c-Src und die Mitglieder der Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Familie *extracellular signal-regulated kinase 1/2* (Erk-1/2) zu aktivieren (Luttrell, 1999). Dieser Befund wurde in den nächsten Jahren verfeinert: So wurde klar, dass β -Arrestine an einer Signalkaskade beteiligt sind, die G-Protein-unabhängig abläuft und damit eigenständig neben G-Protein-vermittelter Signaltransduktion steht (Azzi, 2003, Luttrell, 2001, Seta, 2002, Wei, 2003). Weiterhin zeigte sich, dass β -Arrestine als Gerüstproteine fungieren, die verschiedene Proteine der MAPK-Kaskade wie c-Raf, *mitogen-activated protein kinase kinase 1* (MKK1) und Erk-2 in große räumliche Nähe zu einander bringen und so die Aktivierung der letzten Signaleinheit optimal gewährleisten (Luttrell, 2001). Dabei wurde die Rekrutierung von β -Arrestinen an die Plasmamembran als entscheidender Aktivierungsschritt der gesamten Signalkaskade ausgemacht (Terrillon, 2004). So konnte durch eine exogen induzierte Rekrutierung von β -Arrestinen an ein myristoyliertes, membranassoziiertes Protein gezeigt werden, dass diese Änderung der subzellulären Lokalisation von β -Arrestin ohne Aktivierung eines GPCR ausreicht, um eine Phosphorylierung von Erk-1/2 zu induzieren. Interessanterweise zeigte sich, dass im Konzept des *biased agonism* (vgl. Abschnitt 3.1.3) viele Liganden existieren, die distinkte Rezeptorkonformationen stabilisieren, welche entweder nur G-Protein-abhängig oder nur G-Protein-unabhängig und β -Arrestin-vermittelt Signaltransduktionsprozesse auslösen (Rajagopal, 2010).

3.1.6 GPCR bei der Nozizeption

GPCR sind an der Regulation einer Vielzahl von physiologisch wichtigen Prozessen beteiligt. Beispiele hierfür sind die Sinneswahrnehmungen des Sehens, Riechens und Schmeckens, die homöostatische Regulation des Energiehaushaltes und des Blutdruckes, verschiedene höhere Leistungen des Gehirns oder die Rekrutierung von Immunzellen ins Gewebe (Bockaert, 1999, Pierce, 2002, Schoneberg, 1999).

Im Rahmen dieser Arbeit ist die besondere Bedeutung von GPCR bei der Nozizeption von Belang und wird daher im folgenden Abschnitt genauer beschrieben. Unter dem Begriff Nozizeption wird die Detektion eines noxischen Reizes durch Neurone des peripheren Nervensystems, die als Nozizeptoren bezeichnet werden, verstanden (Sherrington, 1903). Das Soma der Nozizeptoren befindet sich in den Spinalganglien bzw. dem *Ganglion trigeminale* (Snider, 1998). Aufgrund ihrer Morphologie können Nozizeptoren als pseudo-unipolare Neurone beschrieben werden, deren peripherer Teil des Axons im jeweiligen Zielgewebe für die Reizaufnahme zuständig ist und deren zentraler Fortsatz des Axons im spinalen Hinterhorn bzw. im *Nucleus spinalis nervi trigemini* sekundäre Projektionsneurone innerviert (Woolf, 2007). Die sensorische Leistung eines Nozizeptors im Bereich der peripheren Endigung wird durch die Expression geeigneter Rezeptormoleküle erbracht, die charakteristischerweise hohe Reizschwellen aufweisen (Ramsey, 2006). Letztlich wird die Detektion eines Reizes durch einen Nozizeptor in eine Veränderung dessen Membranpotentials, vermittelt durch die Aktivierung oder Inhibition von Ionenkanälen, übersetzt, was schließlich zur Generierung von Aktionspotentialen führen kann (Woolf, 2007).

Nozizeptoren sind in der Lage, auf eine längerfristige Stimulation mit plastischen Veränderungen zu reagieren, die unter dem Begriff der Sensitisierung zusammengefasst werden (Hucho, 2007). Im Unterschied zu anderen sensorischen Systemen, in denen negative Rückkopplungsschleifen vorherrschen, führt eine längerfristige Stimulation von Nozizeptoren demnach zur Verstärkung der zellulären Antwort auf noxische Reize (Hyperalgesie) und sogar zur Detektion von vorher unerschwelligen, nicht noxischen Reizen (Allodynie). GPCR können in Nozizeptoren durch die Aktivierung intrazellulärer Signalkaskaden sowohl auf die akute Ionenkanalaktivität Einfluss nehmen als auch zur Sensitisierung des Nozizeptors beitragen (vgl. Abbildung 3.6).

Verschiedene Vertreter der *transient receptor potential cation channel* (TRP)-Familie werden in Nozizeptoren exprimiert und können in ihrer Ionenkanalaktivität durch verschiedene GPCR metabotrop reguliert werden (Venkatachalam, 2007). Der TRPV1 (*vanilloid 1*)-Ionenkanal ist dabei ein besonders gut untersuchter Vertreter. Ursprünglich wurde ermittelt, dass der TRPV1 durch verschiedene Liganden, u. a. durch Capsaizin (CAP), ein Bestandteil von Pflanzen der Gattung *Capsicum*, durch Protonen sowie durch Wärme aktiviert wird (Caterina, 1997, Tominaga, 1998), so dass der TRPV1 als polymodaler Ionenkanal bezeichnet wird. Allerdings kann die Aktivität des TRPV1 auch metabotrop über GPCR gesteigert werden. So ist beispielsweise die PKC-vermittelte Phosphorylierung des TRPV1 als wichtiger sensitisierender Mechanismus identifiziert worden, über den eine große Gruppe verschiedener GPCR ihre pro-algetische Wirkung entfaltet (Dai, 2004, Moriyama, 2003, Ohta, 2006, Plant,

2007, Tominaga, 2001, Vellani, 2010, Moriyama, 2005). Dabei wird die PKC in Nozizeptoren entweder durch $G_{q/11}$ -koppelnde GPCR (z. B. Bradykinin-2- oder Histamin-1-Rezeptoren) aktiviert (vgl. Abschnitt 3.1.5.3), oder die Stimulation von $G_{s/olf}$ -gekoppelten GPCR vermittelt über einen Nozizeptor-spezifischen Signalweg, in dem Epac (vgl. Abschnitt 3.1.5.1) eine entscheidende Rolle spielt, die PKC-Aktivierung (Hucho, 2005).

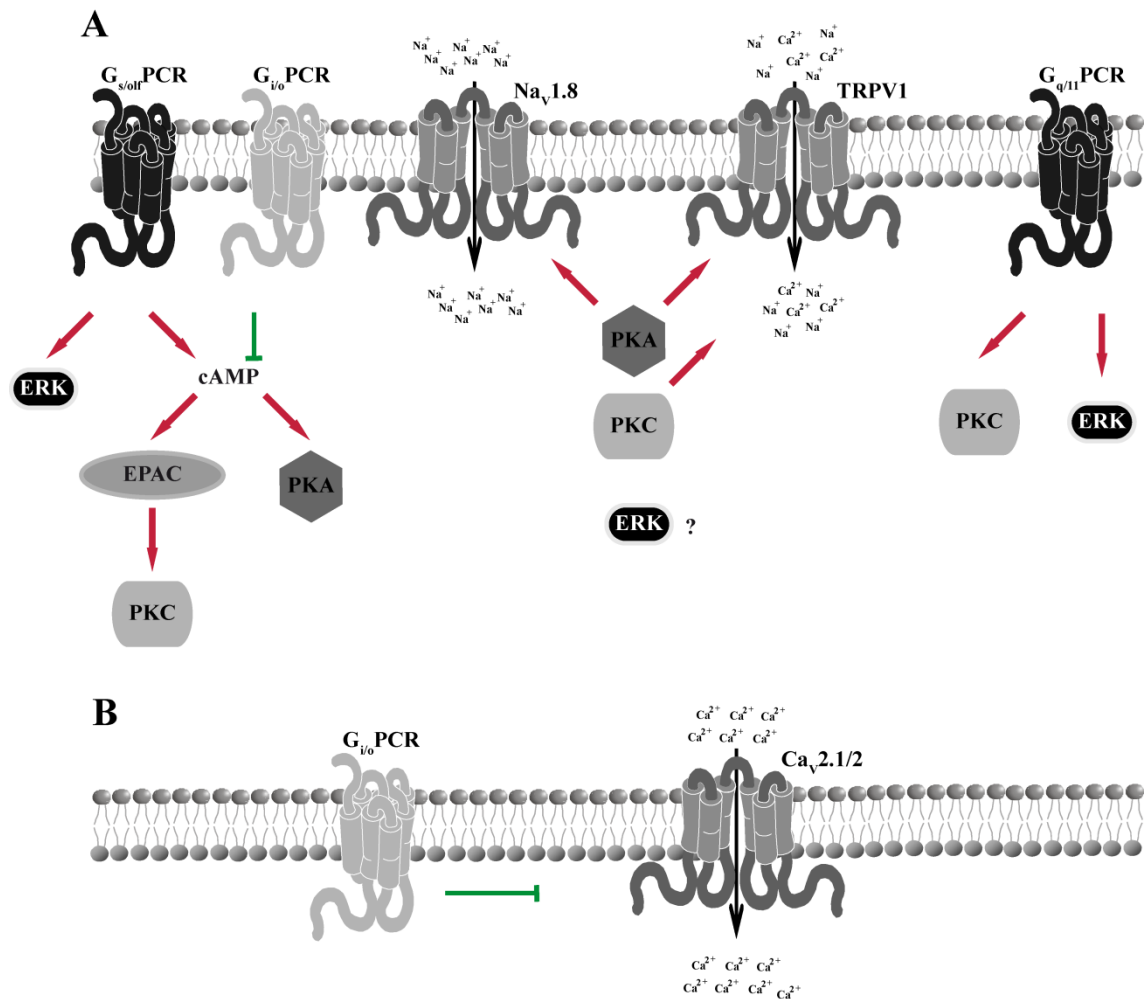


Abbildung 3.6: Periphere und zentrale Modulation der Nozizeptoraktivität durch GPCR

Periphere (A) und zentrale (B) Mechanismen der GPCR-vermittelten Modulation distinkter Ionenkanäle in Nozizeptoren sind dargestellt. Die Stimulation von $G_{s/olf}$ -koppelnden GPCR vermittelt über cAMP die Aktivierung von PKA und PKC, während $G_{q/11}$ -koppelnden GPCR nur die PKC aktivieren. Die PKA sensibilisiert $Na_v1.8$ - und TRPV1-Ionenkanäle durch Phosphorylierung und die PKC ist nur für eine Sensibilisierung des TRPV1 verantwortlich. Die Erk-1/2 (ERK) wird durch beide GPCR-Klassen aktiviert und trägt durch bislang nicht identifizierte Signalwege zur Sensibilisierung des Nozizeptors bei. Damit wirken sich $G_{s/olf}$ - und $G_{q/11}$ -aktivierende Liganden pro-algetisch (rote Pfeile) aus. $G_{i/o}$ -koppelnde GPCR wirken analgetisch (grün), indem peripher die $G_{s/olf}$ -vermittelte cAMP-Produktion und zentral die Aktivität von $Ca_v2.1/2$ -Ionenkanälen inhibiert wird.

Unabhängig von diesem Signalweg stellt die PKA eine wichtige Signaltransduktionskomponente $G_{s/olf}$ -abhängiger pro-algetischer Effekte dar (Hucho, 2007). So wurde evident, dass die pharmakologische Inhibition der PKA der

Nozizeptorsensibilisierung entgegenwirken kann (Aley, 1999, Malmberg, 2001). Eine genauere Analyse von Zielstrukturen, die durch eine erhöhte PKA-Aktivität phosphoryliert wurden, ergab, dass die Aktivierungsschwelle von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen, vor allem der Nozizeptor-spezifischen Isoform Nav1.8, durch die PKA gesenkt und damit die Erregbarkeit des gesamten Nozizeptors gesteigert wird (Fitzgerald, 1999). Eine weitere wichtige Zielstruktur der PKA stellt der TRPV1 dar, der durch eine PKA-vermittelte Phosphorylierung ebenfalls sensibilisiert wird (Bhave, 2002). Neben PKA und PKC wurden auch verschiedene Vertreter der MAPK-Familie, u. a. die Erk-1/2, als wichtige pro-algetische Signaltransduktionskomponenten von GPCR identifiziert (Aley, 2001, Hucho, 2007, Ji, 2009). Allerdings sind die genauen Zielstrukturen der MAPK im Zuge der Nozizeptorsensibilisierung weniger gut etabliert. So sind möglicherweise auch transkriptionelle Regulationsprozesse beteiligt, die beispielsweise in einer Geninduktion des TRPV1 resultieren können (Ji, 2002). Ebenso ist der genaue Aktivierungsweg der Erk-1/2 unklar, da konvergierende Signaltransduktionsprozesse ausgehend von GPCR über verschiedene G-Proteine oder G-Protein-unabhängig (vgl. Abschnitt 3.1.5.5) beschrieben wurden (Osmond, 2005).

Die $G_{i/o}$ -vermittelten analgetischen Effekte werden auf Ebene des Nozizeptors im Wesentlichen über zwei unabhängige Mechanismen vermittelt. Zum einen wirkt die Inhibition der cAMP-Produktion den pro-algetischen Effekten über die PKA bzw. Epac entgegen (Hucho, 2007). Diese Wirkung läuft dabei in der peripheren Endigung des Nozizeptors ab, während zum anderen die Inhibition von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen (vgl. Abschnitt 3.1.5.2), v. a. $\text{Ca}_v2.1$ und 2.2, im Bereich der zentralen Endigung vermittelt wird (Staats, 2004, Wang, 2000) und dort die effektive synaptische Transmission blockiert. Beispiele analgetisch wirkender GPCR sind die Opioidrezeptoren, Cannabinoidrezeptoren oder $\alpha_{2A/C}$ -Adrenorezeptoren (Pan, 2008).

3.1.7 Regulation von GPCR durch anhaltende Ligandenstimulation

3.1.7.1 Allgemeine Abläufe

Die Aktivierung eines GPCR führt zur Induktion intrazellulärer Signaltransduktionsprozesse (vgl. Abschnitt 3.1.5). Diese Prozesse dienen zum einen der Signalweiterleitung. Zum anderen wird parallel eine Rückkopplung zum aktivierten GPCR ausgelöst mit dem Ziel, die Signalweiterleitung abzuschalten. Dieses negative Rückkopplungsprinzip existiert in vielen biologischen Systemen und dient immer der temporären Formung von Signalen und damit der Aufrechterhaltung der Ansprechbarkeit eines Systems.

Im Falle der GPCR läuft die Rückkopplung in mehreren Schritten ab. Innerhalb von wenigen Minuten kommt es über zwei Gruppen von Kinasen, PKA und PKC sowie

GRK, zur Rezeptorphosphorylierung, welche anschließend die Bindung von β -Arrestin-Molekülen nach sich zieht. Durch diese Prozesse, als Desensibilisierung bezeichnet, wird dem GPCR die Möglichkeit genommen, sein kognates G-Protein zu binden und zu aktivieren. Die Rekrutierung von β -Arrestinen führt dann zur Rezeptorendozytose, womit zum einen der GPCR nicht mehr für die weitere Bindung seines Liganden zur Verfügung steht, aber zum anderen auch die Rückführung des GPCR an die Zellmembran und damit dessen Resensibilisierung eingeleitet wird. Schließlich kann eine längere Ligandenstimulation über mehrere Stunden auch zur Degradation des GPCR führen, indem endozytierte GPCR lysosomal degradiert werden sowie deren *de novo* Transkription und Translation vermindert abläuft.

3.1.7.2 Entkopplung des GPCR vom kognaten G-Protein

Eine Agonisten-vermittelte Desensibilisierung eines GPCR wird über dessen Phosphorylierung vermittelt. Dabei kann die homologe und heterologe Desensibilisierung unterschieden werden (Sibley, 1985a, Sibley, 1985b). Die ermittelten Phosphorylierungsstellen einer homologen oder heterologen Desensibilisierung können partiell überlappen (Blaukat, 2001) und sind, im Falle einiger Ordorantrezeptoren, sogar beide notwendig, um die Agonisten-vermittelte Desensibilisierung zu vermitteln (Boekhoff, 1994). Mechanistisch wird die heterologe Desensibilisierung über Kinasen vermittelt, die durch sekundäre Botenstoffe aktiviert werden, beispielsweise die PKA oder die PKC (Ferguson, 1998). Dabei können sowohl aktivierte, das heißt Agonist-gebundene GPCR, als auch nicht aktivierte GPCR phosphoryliert werden. Als verantwortliche Kinase für die homologen Desensibilisierung des β -Adrenozeptors wurde eine bislang unbekannte Kinase identifiziert und als *β adrenergic receptor kinase* benannt, welche sich als GRK-Isoform 2 in der aktuellen Nomenklatur wiederfindet (Benovic, 1987, Ferguson, 2001).

Die GRK-Familie wird von sieben Isoformen gebildet. Dabei zeigen die Isoformen 1 und 7 eine selektive Expression in der Retina und die Isoform 4 ist nur im Hoden zu finden, während die vier anderen Isoformen ubiquitär exprimiert werden (Luttrell, 2010). Verschiedene GRK-Isoformen weisen eine distinkte subzelluläre Lokalisation auf, wobei die Isoformen 2 und 3 zytoplasmatisch zu finden sind und die Isoformen 4, 5 und 6, teilweise durch eine Palmitoylierung, konstitutiv an der Zellmembran residieren (Ferguson, 2001). Die Rekrutierung der Isoformen 2 und 3 an die Zellmembran wird hauptsächlich über die Bindung von aktivierten $G_{\beta\gamma}$ -Komplexen vermittelt (Boekhoff, 1994), allerdings spielen PIP_2 in der Zellmembran sowie verschiedene Phosphorylierungen ebenso eine Rolle (Pitcher, 1999, Pitcher, 1995). Im Bereich der dritten intrazellulären Schleife und des C-Terminus erfolgt nach der Rekrutierung an die Zellmembran die Phosphorylierung des GPCR durch die GRK

(Ferguson, 2001). Dabei konnte bislang keine eindeutige Konsensussequenz identifiziert werden, es wurde aber klar, dass die Phosphorylierung allein nicht ausreicht, um die Desensibilisierung des GPCR und Entkopplung von seinem kognaten G-Protein zu erklären. Vielmehr wurden Arrestin und β -Arrestin 1 (Arrestin 1 bzw. 2 der aktuellen Nomenklatur) kloniert und es zeigte sich, dass diese an phosphorylierte GPCR binden und an deren Desensibilisierung mitwirken können (Lohse, 1990, Wilden, 1986, Benovic, 1987). Korrekterweise muss darauf hingewiesen werden, dass zwar in deutlich mehr Fällen eine GRK-vermittelte Phosphorylierung der Arrestin-Bindung voraus geht, in anderen Fällen aber auch eine heterologe Phosphorylierung vor der Arrestin-Bindung beschrieben wurde (Hanyaloglu, 2001, Namkung, 2004).

Die Arrestin-Familie besteht aus vier Isoformen, dabei sind wiederum zwei Isoformen (1 und 4) spezifisch in der Retina exprimiert, während die anderen (Arrestin 2 und 3 bzw. β -Arrestin 1 und 2) ubiquitär exprimiert werden (Ferguson, 2001). Die Rekrutierung von Arrestinen an einen GPCR erfordert nun zwei molekulare Determinanten (Gurevich, 2006), die gleichzeitig erfüllt sein müssen. Einerseits muss der Rezeptor in einer aktiven Konformation vorliegen, andererseits muss der Rezeptor im Bereich der dritten intrazellulären Schleife bzw. des C-Terminus phosphoryliert worden sein, wobei zwei Phosphatreste in großer räumlicher Nähe von Arrestinen bevorzugt werden. Das gleichzeitige Vorhandensein beider molekularer Determinanten induziert nun eine Konformationsänderung des Arrestin-Moleküls, bei der der auto-inhibitorische C-Terminus die hoch-affine GPCR-Bindestelle freilegt und es somit zu einer stabilen Arrestin-GPCR-Interaktion kommt. Diese führt nun aus sterischen Gründen zur anhaltenden Verhinderung der Interaktion des GPCR mit dem kognaten G-Protein (Krupnick, 1997).

3.1.7.3 Agonisten-vermittelte GPCR-Endozytose

Viele GPCR werden nach einer längerfristigen Stimulation mit ihrem Agonisten endozytiert. Allerdings existieren einige wenige Rezeptoren, die nicht endozytiert werden, bzw. es existieren Liganden (Keith, 1996), die einen gegebenen GPCR aktivieren, aber nicht endozytieren (z. B. Morphin und der μ -Opioidrezeptor). Zu den Endozytose-resistenten GPCR gehören u. a. der β_3 -Adrenozeptor, der Somatostatin-4-Rezeptor, der κ -Opioidrezeptor und der Prostaglandin-E2-Rezeptor (Chu, 1997, Csaba, 2001, Nantel, 1993, Penn, 2001).

Mechanistisch werden drei unterschiedliche Endozytosewege unterschieden: Die Arrestin-abhängige Endozytose über Stachelsaumgrübchen, Klathrin und Dynamin, die Arrestin-unabhängige Dynamin-abhängige Endozytose über Caveolae und die Arrestin- und Dynamin-unabhängige Endozytose über einen bislang nicht genauer definierten Internalisierungsweg (Claing, 2002).

Die Arrestin-abhängige Endozytose zeichnet sich durch die Rekrutierung eines GPCR in Stachelsaumgrübchen aus. Für die Konzentrierung der GPCR in diesen Membraninvaginationen zeichnet die Adapterfunktion des Arrestins verantwortlich. So ist der auto-inhibitorische C-Terminus von Arrestinen in GPCR-Arrestin-Komplexen in der Lage, sowohl Klathrin als auch dessen Adapterprotein 2 zu binden (Goodman, 1997, Laporte, 1999). Indem Arrestin also die zur Endozytose vorgesehenen GPCR mit dem intrazellulär aufliegenden Proteinbesatz eines Stachelsaumgrübchens strukturell verbindet, wird die laterale Diffusion des GPCR in der Zellmembran verhindert und der Rezeptor verbleibt im abzuschnürenden Membranabschnitt. Das finale Abschnüren eines Vesikels erfolgt schließlich unter Verbrauch von GTP durch Dynamin.

In diesem letzten Schritt der Fission stimmt die Endozytose über Caveolae mit derer über Klathrin überein. Caveolae zeichnen sich ansonsten durch die Anwesenheit der namensgebenden Caveolin-Proteine sowie des kürzlich identifizierten *polymerase 1 transcript release factor* aus (Aboulaich, 2004). Ansonsten ist das Wissen über diesen Endozytoseweg immer noch unvollständig, so dass GPCR, beispielsweise der Endothelin-B-Rezeptor, nur aufgrund der Inhibition der Endozytose durch eine dominant-negative Dynamin-Mutante und der gleichzeitig fehlenden Inhibition durch ein dominant-negatives Arrestin in diese Gruppe der GPCR-Endozytose einsortiert werden (Claing, 2002).

Die Gruppe der Arrestin- und Dynamin-unabhängig endozytierenden GPCR wird beispielsweise vom Secretin- oder vom M2-Acetylcholinrezeptor, aber auch vom Bradykinin-2-Rezeptor (B2R), gebildet (Walker, 1999, Lamb, 2001, Pals-Rylaarsdam, 1997). Allerdings sind die genauen molekularen Abläufe einer so gearteten Endozytose bislang unbekannt.

3.1.7.4 GPCR-Degradation und -Resensitisierung

Eine Zelle muss nach erfolgter Endozytose eines GPCR entscheiden, was mit diesem GPCR passieren soll. Prinzipiell sind zwei Wege denkbar: Ein Transport zurück zur Zellmembran, um wieder aktivierbare Rezeptoren auf der Zelloberfläche zu verankern (Resensitisierung), oder die Degradation des Rezeptors durch einen Transport ins lysosomale Kompartiment (Ferguson, 2001). Beide Prozesse können prinzipiell ablaufen, es scheint aber sowohl vom jeweiligen Rezeptor als auch vom genutzten zellulären System abhängig zu sein, welcher der beiden Wege präferentiell abläuft. Oakley und Kollegen schlugen ein Modell vor, nach dem die Eigenschaften der Interaktion zwischen GPCR und Arrestinen über Resensitisierung oder Degradation des GPCR entscheiden (Oakley, 2000). Sie teilten GPCR in zwei Gruppen, A und B, ein (nicht zu verwechseln mit den GPCR-Familien aus Abschnitt 3.1.2). Die Gruppe A, u. a. bestehend aus dem $\beta 2$ -Adrenozeptor, dem μ -Opioidrezeptor und dem Endothelin-A-

Rezeptor, zeichnet sich durch eine höhere Affinität zu Arrestin 3 im Vergleich zu Arrestin 2 aus. Außerdem werden die visuellen Arrestine 1 und 4 durch Rezeptoren dieser Gruppe nicht gebunden. Die Rezeptoren der Gruppe B, u. a. der Angiotensin-1A- und der Vasopressin-2-Rezeptor, zeigten keine distinkten Affinitäten zu β -Arrestinen und konnten außerdem auch die visuellen Arrestine binden. Dieses Bindungsverhalten war begleitet von einer transienten (Gruppe A) bzw. anhaltenden (Gruppe B) Interaktion mit Arrestinen und resultierte präferentiell in schneller (Gruppe A) bzw. sehr langsamer (Gruppe B) Resensitisierung. Langsam resensitisierende Rezeptoren wurden zusätzlich deutlich häufiger lysosomal degradiert (Gurevich, 2006). Dieser phänotypischen Einteilung konnten auch einige zu Grunde liegende molekulare Determinanten zugeordnet werden. So war der Austausch des C-Terminus zwischen β 2-Adrenozeptor und Vasopressin-2-Rezeptor ausreichend, um den Phänotyp der jeweiligen anderen Gruppe zu übertragen (Oakley, 1999). Bislang konnte jedoch noch nicht vollständig geklärt werden, wieso eine stabilere Interaktion eines GPCR mit Arrestinen zu einer vermehrten Degradation führt. Möglicherweise konnte dies experimentell ermittelt werden, indem gezeigt wurde, dass die Arrestin-abhängige Ubiquitinierung eines GPCR ein Signal für dessen Degradation darstellt (Martin, 2003). Zusätzlich muss darauf hingewiesen werden, dass einige Rezeptoren, z. B. der β 3-Adrenozeptor, nach kurzzeitiger Ligandenstimulation nicht endozytiert werden, jedoch nach anhaltender Stimulation lysosomal degradiert werden (Nantel, 1994), so dass weitere Wege des GPCR-Abbaus unabhängig von der kurzzeitigen Liganden-abhängigen Endozytose bestehen müssen.

Der Resensitisierung eines GPCR geht die Dissoziation des Arrestin-Rezeptor-Komplexes voraus. Sie wird durch das Ansäuern des endosomalen Kompartimentes ausgelöst. Die Verringerung des pH-Wertes zieht u. a. eine Konformationsänderung des Rezeptors nach sich, so dass die hoch-affine Bindung des Arrestins nicht mehr möglich ist (Gurevich, 2006, Krueger, 1997). So werden die Phosphatreste des GPCR freigelegt, die daraufhin von der membranassoziierten Proteinphosphatase A2 abgespalten werden können (Krueger, 1997). Der dephosphorylierte, inaktive GPCR kann nun über vesikuläre Transportprozesse wieder an die Zellmembran gelangen und steht dort für eine neuerliche Signalaufnahme zur Verfügung.

3.1.7.5 Bedeutung der Liganden-vermittelten GPCR-Regulation

Der gesamte Prozess der Liganden-vermittelten GPCR-Regulation, bestehend aus Rezeptorphosphorylierung, Arrestin-Bindung, Endozytose, Arrestin-Dissoziation, Dephosphorylierung und Rücktransport an die Zellmembran, ist für die anhaltende Ansprechbarkeit eines GPCR unerlässlich. Damit ist das Wissen über die Liganden-vermittelte Regulation eines GPCR von großer Bedeutung, um im Zuge einer

Wirkstoffentwicklung die pharmakodynamischen Prozesse der Interaktion eines Wirkstoffs mit einem GPCR erfolgreich zu optimieren. Diese große Bedeutung wird beispielsweise bei der Betrachtung der Opioidrezeptoren evident, für die das sog. RAVE (*receptor activity versus endocytosis*)-System in Bezug auf pharmakodynamische Interaktionen von Opioiden mit Opioidrezeptoren etabliert worden ist (Whistler, 1999). Demnach wird die Toleranz, die durch verschiedene Opioide, insbesondere durch Morphin, ausgelöst wird, mit der Unfähigkeit zur Induktion der Endozytose des μ -Opioidrezeptors korreliert. Dieser Vorschlag konnte kürzlich *in vivo* bestätigt werden (Kim, 2008), so dass die Analyse der Liganden-vermittelten Regulation eines GPCR immer an der grundlegenden Charakterisierung neuer pharmakologischer Zielstrukturen beteiligt sein sollte.

3.2 Die Familie der Mrg-Rezeptoren

3.2.1 Allgemeines und Nomenklatur

Chronische Schmerzen, insbesondere solche neuropathischen Ursprungs, sind ein großes medizinisches Problem, da nur ein Teil der Patienten auf die bislang verfügbaren analgetischen Therapien anspricht und diese Patienten auch keine vollständige Analgesie erfahren (Dworkin, 2010, O'Connor, 2009). Zusätzlich weisen viele, zur Zeit eingesetzte Wirkstoffe schwere Nebenwirkungen auf: Beispielsweise lösen Opioide Übelkeit, Müdigkeit, Konstipation und Abhängigkeit aus, während trizyklische Antidepressiva zu anti-cholinergen Effekten bzw. selektive Serotonin/Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer zu Übelkeit, Reizleitungsstörungen am Herzen und Hypertension führen können (Dworkin, 2010, O'Connor, 2009). Daher ist die Identifizierung und Etablierung neuer Zielstrukturen, möglichst mit spezifischer Expression im schmerzleitenden System, eine wichtige Aufgabe der pharmakologischen Forschung, um neue Möglichkeiten der analgetischen Therapie aufzuzeigen.

In diesen Kontext ist die Entdeckung der Familie der Mrg-Rezeptoren einzuordnen. Mrg-Rezeptoren wurden im Jahr 2001 von Xinzhong Dong und Kollegen erstmals beschrieben (Dong, 2001) und kommen spezifisch in nozizeptiven Spinalganglienneuronen vor. Um Nozizeptor-spezifische Gene zu finden, subtrahierten die Autoren die exprimierten Gene von Neurogenin-1-defizienten, murinen Spinalganglienneuronen von jenen, die aus WT-Spinalganglienneuronen isoliert wurden. Dabei war bereits bekannt, dass der Transkriptionsfaktor Neurogenin-1 für die Entstehung von Nozizeptoren unerlässlich ist, während andere Spinalganglienneurone in Neurogenin-1-defizienten Tieren normal entstehen (Ma, 1999). Mit dieser Strategie konnte das Gen eines bislang unbekannten GPCR isoliert werden, der 35 % Sequenzhomologie zum Onkogen MAS1 aufweist (Young, 1986), und daher als *Mas-related gene* (Mrg) bezeichnet wurde.

Fast zeitgleich dazu war eine Gruppe um Paola Lembo ebenfalls auf der Suche nach bislang unbekannten GPCR, die spezifisch in Nozizeptoren exprimiert werden (Lembo, 2002). Im Unterschied zu Dong wurde in dieser Arbeit cDNA aus den Spinalganglien von Ratten genutzt, um neue GPCR-kodierende Gene zu finden. Dabei gelang die Isolation eines neuen GPCR, bei dem ebenso eine hohe Sequenzhomologie zu MAS1 beobachtet wurde. Die Gruppe um Lembo bezeichnete dieses Gen aufgrund seiner selektiven Expression in Nozizeptoren als *sensory neuron-specific receptor* (SNSR), so dass damit parallel zwei Nomenklaturen begründet wurden.

Bislang hat die *international union of basic and clinical pharmacology*, welche für allgemein gültige Regeln zur Nomenklatur von GPCR, Ionenkanälen und ihrer

Liganden zuständig ist (Foord, 2005), für die Mrg- bzw. SNSR-Rezeptoren keine finale Nomenklatur beschlossen. Daher werden in der Literatur verschiedene Nomenklaturen verwendet. Die „Mrg“-Nomenklatur scheint sich jedoch durchzusetzen und soll somit auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet werden.

3.2.2 Mitglieder der Mrg-Rezeptorfamilie

Ausgedehnte Datenbankrecherchen führten zur Identifikation von insgesamt 53 Mrg-Genen, allerdings stellen 21 davon Pseudogene dar (Dong, 2001). Aufgrund von Sequenzhomologien wurde die murine Mrg-Rezeptorfamilie in insgesamt acht Subfamilien eingeteilt. Dabei zeichneten sich die ersten beiden Subfamilien A und B durch 16 bzw. zehn exprimierte Mitglieder aus, während die anderen Subfamilien C bis H nur je ein Mitglied haben (Abbildung 3.7).

Nachdem das humane Genom auf die Existenz von homologen Genen untersucht wurde, zeigte sich, dass die Einteilung in die Subfamilien A bis H nicht komplett auf das humane Genom übertragen werden kann (Abbildung 3.7). Im Menschen finden sich zwar die Subfamilien D bis G wieder, im Unterschied dazu existieren die murinen Subfamilien A, B und C aber überhaupt nicht. Allerdings konnte eine neue Subfamilie identifiziert werden, die als MrgX-Rezeptoren bezeichnet wurde (Dong, 2001, Lembo, 2002). Interessanterweise konnte durch weitere Arbeiten ermittelt werden, dass die MrgX-Rezeptoren nicht human-spezifisch sind, sondern auch in Rhesusaffen und Makaken vorkommen (Burstein, 2006, Zhang, 2005a).

Die Mrg-Rezeptorfamilie der Ratte (Abbildung 3.7) ähnelt zu großen Teilen derer der Maus. So existieren ebenso die Subfamilien A bis H (Lembo, 2002, Zylka, 2003). Allerdings fehlen in der Subfamilie C alle 13 Pseudogene, so dass diese Subfamilie nur aus einem exprimierten Gen besteht. Außerdem besteht auch die Subfamilie A nur aus einem exprimierten GPCR und die Subfamilie B ist von zehn auf sechs exprimierte Mitglieder verkleinert. Die beobachtete atypische Vermehrung von murinen Genen im Vergleich zur Ratte wird dabei auf die Insertion des Retrotransposons L1 und dadurch ausgelöste ungleiche Rekombinationsereignisse im Genom der Mausspezies nach der evolutiven Trennung von der Rattenspezies zurückgeführt (Zylka, 2003).

Die Mrg-Rezeptoren können strukturell in die Gruppe A (vgl. Abschnitt 3.1.2) der GPCR eingeordnet werden. Sie zeigen beispielsweise das typische NPxxY-Motiv in der transmembranären Domäne 7. Allerdings ist das ebenso typische E/DRY-Motiv am zytoplasmatischen Ende der transmembranären Domäne 3 bei allen Isoformen in E/DRC verändert (Burstein, 2006, Dong, 2001, Lembo, 2002). Dieser Veränderung konnte bisher allerdings keine spezifische Funktion zugewiesen werden.

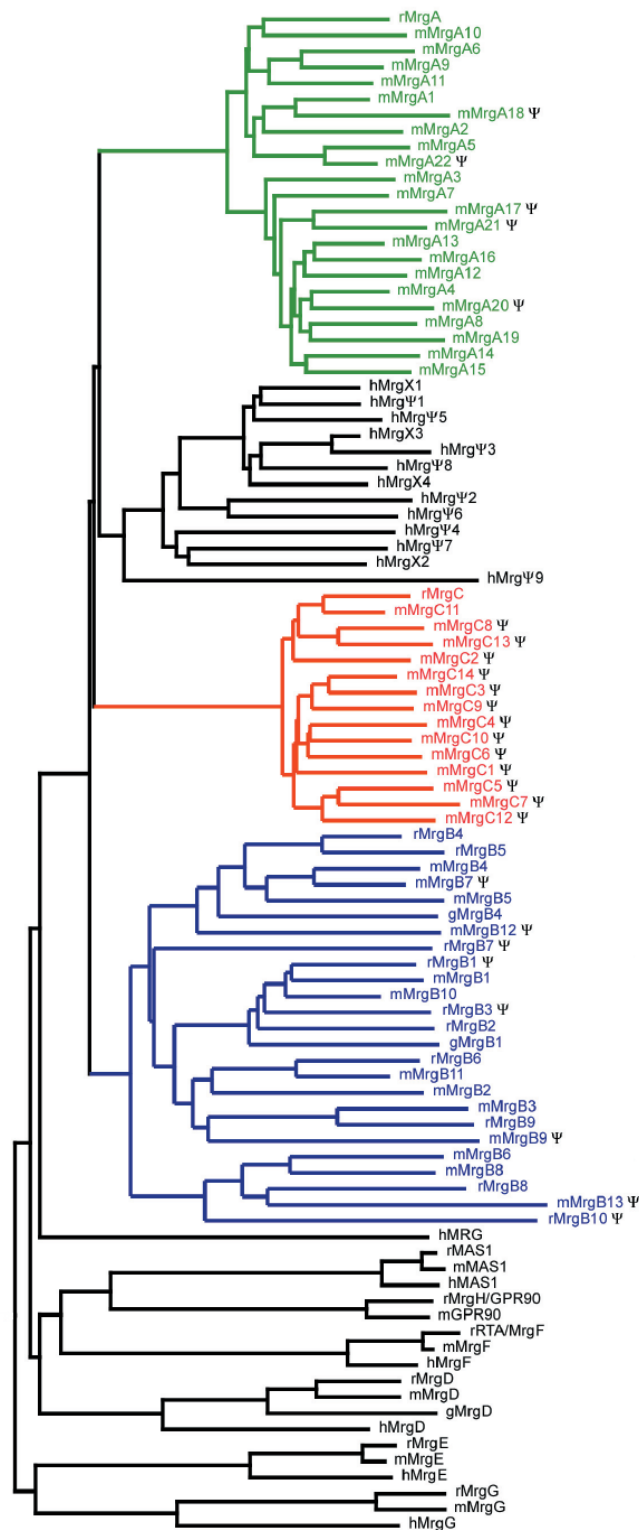


Abbildung 3.7: Phylogenetischer Baum der Mrg-Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte
 Abstammungsbeziehung der Mrg-Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte, verändert nach Zylka, 2003. Die Subfamilien A, B, C und X sind farblich voneinander abgesetzt. Pseudogene wurden in die Darstellung eingeschlossen und durch ψ gekennzeichnet. Die Zugehörigkeit zu einer Spezies ist durch ein Kürzel (m für Maus, r für Ratte und h für Mensch) vor dem Namen des jeweiligen Rezeptors angegeben.

3.2.3 Liganden von Mrg-Rezeptoren

In einem Rasteransatz unter Nutzung einer Peptidbibliothek konnte für die murinen MrgA-Isoformen 1 und 4 RF-Amid-Peptide, bekannt als Neurotransmitter bei Mollusken (Greenberg, 1992), bzw. Neuropeptid-AF (NPAF), ein entsprechendes homologes Peptid der Säugetiere (Vilim, 1999), als Agonisten mit einem EC₅₀-Wert von ~50 nM identifiziert werden (Dong, 2001). Für den MrgA3-Rezeptor wurde das Anti-Malaria-Medikament Chloroquin als Agonist ermittelt (Liu, 2009). In der gleichen Arbeit konnte zudem gezeigt werden, dass Chloroquin den MrgA-Rezeptor der Ratte ebenso aktivieren kann.

Die Liganden für alle MrgB-Rezeptoren und die Rezeptoren der Subfamilien E, F, G und H sind bislang unbekannt. Das Ligandenprofil der Primaten-spezifischen MrgX-Rezeptoren soll in Abschnitt 3.3 ausführlich diskutiert werden. Für den humanen Vertreter der MrgD-Subfamilie wurde β -Alanin als Agonist ermittelt (Shinohara, 2004). Dieser Befund wurde sodann auch für den MrgD-Rezeptor der Ratte bestätigt (Ajit, 2010, Crozier, 2007, Milasta, 2006). Damit stellen die MrgD-Rezeptoren von Primaten und Nagetieren eine Subfamilie homologer Proteine dar, die durch β -Alanin aktiviert werden können.

Die MrgC-Rezeptoren aus Maus (mMrgC) bzw. Ratte (rMrgC) werden beide von Peptiden unterschiedlicher Struktur gebunden und aktiviert (Grazzini, 2004, Han, 2002). Als übereinstimmende Struktur der verschiedenen Liganden konnte jedoch das Vorhandensein der Aminosäuresequenz RF(Y)G bzw. RF(Y)-Amid am C-Terminus identifiziert werden. Alle bislang identifizierten MrgC-Agonisten werden aus großen Vorläuferproteinen durch proteolytische Spaltung generiert. Es handelt sich um ein Spaltprodukt des Proopiomelanocortins (POMC), γ_2 -MSH (*melanocyte stimulating hormone*); um Spaltprodukte des Proenkephalins (PENK), die BAM (*bovine adrenal medulla*)-Peptide; um ein Spaltprodukt des Prodynorphins, Dynorphin-14 und um Spaltprodukte des Pro-NPFF_A, NPFF und NPAF (Grazzini, 2004, Han, 2002).

Das endogene Vorkommen dieser Spaltprodukte ist z. T. seit vielen Jahren nachgewiesen (Goumon, 2000, Holtt, 1982), da für viele dieser Peptide interessanterweise schon vor der Klonierung der MrgC-Rezeptoren andere Rezeptorproteine identifiziert worden sind. So wurde γ_2 -MSH als Ligand des Melanocortin-3-Rezeptors identifiziert (Oosterom, 1999) und NPFF bzw. NPAF sind in der Lage, NPFF₁- bzw. NPFF₂-Rezeptoren zu aktivieren (Mollereau, 2002). Auch für die BAM-Peptide waren bereits andere Rezeptoren, die Opioidrezeptoren bekannt (Quirion, 1983). Interessanterweise zeigte sich jedoch, dass Opioidrezeptor- bzw. MrgC-Rezeptor-bindende Bereiche der BAM-Peptide strukturell voneinander getrennt werden können. So werden Opioidrezeptoren spezifisch über das N-terminale Metenkephalin-Motiv (YGGFM) gebunden, während das N-terminal trunktierte

BAM8-22 nur noch MrgC-Rezeptoren aktivieren kann (Grazzini, 2004). Die wichtigsten MrgC-Liganden aus den Veröffentlichungen von Han und Grazzini (Grazzini, 2004, Han, 2002), nachgewiesen in rekombinanten zellulären Expressionssystemen, sowie die dort ermittelten EC₅₀-Werte sind zusammenfassend in Tabelle 3.3 dargestellt. Daten zur intrinsischen Effizienz der jeweiligen Peptide fehlen bisher jedoch völlig.

Tabelle 3.3: Übersicht über die Potenz verschiedener Liganden von MrgC-Rezeptoren der Ratte und der Maus

Vorläuferprotein	Ligand	Sequenz	mMrgC	rMrgC
POMC	γ_2 -MSH	YVMGRHFWDRYG	11	37
PENK	BAM1-22	YGGFMRRVGRPE- WWMDYQKRYG	26	155
	BAM8-22	VGRPEWWMDYQKRYG	53	120
Prodynorphin	Dynorphin-14	IRPKLKWDNQKRYG	22	nicht gemessen
Pro-NPFF_A	NPFF	FLFQPQRF	54	1048
	NPAF	AGEGLNSQFWSLAAPQRF	282	594

Die Potenz (EC₅₀ in nM) verschiedener peptiderger Liganden (Sequenz angegeben) in MrgC-Rezeptor-exprimierenden HEK293-Zellen (mMrgC: muriner MrgC; rMrgC: MrgC der Ratte) wurde durch Messung der Ca²⁺-Mobilisation bestimmt (nach Grazzini, 2004 und Han, 2002).

3.2.4 Zelluläre Signalwege von MrgC-Rezeptoren

Partielle Übereinstimmungen der Ligandenselektivität zwischen einigen humanen MrgX (hMrgX)-Rezeptoren und den MrgC-Rezeptoren (vgl. Abschnitt 3.3.2.2) führten seit der ersten Beschreibung der gesamten Mrg-Rezeptorfamilie zu einer Vielzahl von Studien der Signalwege und Funktionen von MrgC-Rezeptoren. Daher konzentriert sich der folgende Abschnitt auf die Beschreibung der Signaltransduktionsprozesse dieser Mrg-Subfamilie.

Trotz oder wahrscheinlich auf Grund der hoch selektiven Expression der MrgC-Rezeptoren in nozizeptiven Spinalganglienneuronen stammen die meisten der bisher gesammelten Daten zur Signalweiterleitung der MrgC-Rezeptoren aus rekombinanten Expressionssystemen. Es konnte ermittelt werden, dass MrgC-Rezeptoren in der Lage sind, Ca²⁺-Ionen aus intrazellulären Speichern freizusetzen (Grazzini, 2004, Han, 2002). Diese Ca²⁺-Mobilisation wird im Falle des mMrgC-Rezeptors über G_{q/11} Proteine vermittelt (vgl. Abschnitt 3.1.5), da die vorherige Behandlung von mMrgC-Rezeptor-exprimierenden HEK (*human embryonic kidney*)-293 Zellen mit PTX keinen Effekt auf die γ_2 -MSH-vermittelte Ca²⁺-Mobilisation hat, diese jedoch bei einer Expression des mMrgC-Rezeptors in G α_q -defizienten, embryonalen Fibroblasten komplett fehlt (Han,

2002). In einer weiteren Arbeit auf zellulärer Ebene konnte die Sensibilisierung des TRPV1 als Zielstruktur des rMrgC-Rezeptors ausgemacht sowie eine Beteiligung der PKC an diesem Signalweg etabliert werden (Honan, 2007). Allerdings gelang es in dieser Studie nicht, die Sensibilisierung des TRPV1 einer spezifischen PKC-Isoform zuzuordnen. Es wurde lediglich ausgeschlossen, dass die nicht-klassischen PKC Isoformen δ und ϵ an der TRPV1-Sensibilisierung beteiligt sind. Außerdem blieb es unklar, warum die Behandlung der Zellen mit BAM8-22 zu einer Sensibilisierung des TRPV1 führte, aber selbst keine Ca^{2+} -Mobilisation aus dem ER auslöste. Interessanterweise konnte auch für den mMrgC-Rezeptor eine funktionelle Interaktion mit dem TRPV1 sowie zusätzlich mit dem TRPA1 (*transient receptor potential cation channel ankyrin 1*) gezeigt werden; die zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege blieben jedoch auch hier unbekannt (Wilson, 2011).

3.2.5 Physiologische Funktionen von MrgC-Rezeptoren

Zurzeit existieren elf Arbeiten, in denen physiologische Funktionen der MrgC-Rezeptoren in Mäusen und Ratten analysiert wurden. In allen Studien zeigte sich eine Modulation der Schmerz Wahrnehmung, was in guter Übereinstimmung zur selektiven Expression in Nozizeptoren steht. Allerdings wurden sowohl pro-algetische als auch analgetische Wirkungen der MrgC-Rezeptoren ermittelt.

Die Injektion von BAM8-22 oder γ_2 -MSH in die Hinterpfote (intraplantar) bzw. in den spinalen Liquorraum (intrathekal) von Mäusen und Ratten resultierte in akuten Schmerzreaktionen, typischerweise Lecken und Beißen der injizierten Pfote (Chang, 2009, Grazzini, 2004). Die interplantare Gabe von BAM8-22 löste zudem eine mechanische Allodynie der injizierten Pfote aus (Grazzini, 2004). Ebenso wurde eine Sensibilisierung der injizierten Pfote oder bei intrathekalen Gabe des Schwanzes gegenüber Wärme ausgelöst (Chang, 2009, Grazzini, 2004, Ndong, 2009), die durch den Einsatz einer rMrgC-spezifischen siRNA (*small interfering RNA*) blockiert werden konnte (Ndong, 2009). Damit könnte in Ratten ein physiologisches Korrelat der TRPV1-Sensibilisierung (Honan, 2007) ermittelt worden sein. In Mäusen konnte die γ_2 -MSH-induzierte thermische Hyperalgesie durch die Blockade von spinalen N-Methyl-D-aspartat (NMDA)-Typ ionotropen Glutamatrezeptoren sowie durch die Blockade der NO Synthetase verhindert werden (Chang, 2009). Außerdem wurde evident, dass der rMrgC-Rezeptor an der Entstehung inflammatorisch bedingter Schmerzen beteiligt ist, da der Einsatz einer rMrgC-spezifischen siRNA die Schmerzchronifizierung nach intradermaler Injektion von komplettem Freund'schem Adjuvans (Wasser-Öl-Immersion von hitzeinaktiviertem *Mycobacterium tuberculosis*) inhibieren konnte (Ndong, 2009). Die pro-algetische Wirkung von MrgC-Agonisten bei intradermaler und intrathekalen Injektion entspricht zudem der Expression des rMrgC-

Rezeptors, da dieser in freien Nervenendigungen der Haut und in den präsynaptischen Endigungen der primären Afferenzen im spinalen Hinterhorn vorkommt (Hager, 2008). Die partiell TRPV1-abhängige Freisetzung von CGRP (*calcitonin gene-related peptide*) durch rMrgC-Agonisten aus dermalen freien Nervenendigungen konnte als weitere Funktion des rMrgC-Rezeptors nachgewiesen werden (Hager, 2008). Dieser Effekt in guter Übereinstimmung zur Beteiligung an der inflammatorischen Schmerzchronifizierung durch komplettes Freund'sches Adjuvans, da die neurogenen Inflammatorien CGRP und SP (*substance pain*) an dessen Auslösung beteiligt sind (Birklein, 2008).

Diesen Daten widersprechend konnten einige Gruppen ermitteln, dass rMrgC-Rezeptoren vermutlich analgetische Funktionen ausüben. Im Gegensatz zur Induktion von akuten Schmerzreaktionen wird die Detektion eines analgetischen Stimulus erst durch die Anwendung eines Schmerz auslösenden Paradigmas möglich. Dafür wurden in verschiedenen Arbeiten die intraplantare Injektion von Formalin oder komplettem Freund'schem Adjuvans, die Applikation eines thermischen Schmerzreizes, die intrathekale Injektion von NMDA oder die chronische Ligation eines lumbalen Spinalnervens genutzt (Cai, 2007a, Chen, 2006, Chen, 2008, Chen, 2012, Hong, 2004, Zeng, 2004). So behandelte Tiere wurden sodann in zwei Gruppen eingeteilt, eine Vergleichsgruppe und eine Gruppe, die zusätzlich verschiedene rMrgC-Agonisten durch intrathekale Injektion erhielt. Analysiert wurde schließlich das Ausmaß spontaner Schmerzreaktionen, thermischer Hyperalgesie oder mechanischer Allodynie. Dabei ergab sich nach Gabe von rMrgC-Agonisten eine deutlich erhöhte Schmerzschwelle bzw. ein deutlich verringertes Ausmaß an Schmerzreaktionen. Zusätzlich wurde auf molekularer Ebene die spinale Expression von c-Fos (Chen, 2006, Chen, 2008, Zeng, 2004), einem etablierten allgemeinen Schmerzmarker, oder die Induktion des neuropathischen Schmerzmarkers Interleukin 1 β (Chen, 2012) überprüft. MrgC-Agonisten verminderten die Expression dieser molekularen Schmerzmarker deutlich. In vielen dieser Studien wurde allerdings der gemischte rMrgC- und Opioidrezeptor-Agonist BAM1-22 eingesetzt (Cai, 2007a, Chen, 2012, Hong, 2004, Zeng, 2004), so dass keine Spezifität für den rMrgC-Rezeptor bestand. Teilweise wurde zwar versucht, durch den Einsatz des Opioidrezeptor-Antagonisten Naloxon nur noch die rMrgC-spezifischen Effekte messbar zu machen; allerdings veränderte die Gabe von Naloxon die basalen Schmerzantworten so stark, dass nicht klar ist, ob die rMrgC-spezifischen Effekte unter physiologischen Bedingungen ebenso messbar wären. Aussagekräftiger sind dagegen zwei Arbeiten, in denen die rMrgC-spezifischen Agonisten BAM8-22 und γ 2-MSH genutzt wurden und ebenso analgetische Effekte gemessen werden konnten (Chen, 2006, Chen, 2008).

Eine weitere Gruppe von Publikationen schreibt dem rMrgC-Rezeptor eine besondere Funktion bei der Kontrolle der Funktion von Opioidrezeptoren zu. Deren

Toleranzentwicklung gegenüber Morphin und einigen seiner Derivate ist ein ernst zunehmendes Problem der klinischen Schmerztherapie (vgl. Abschnitt 3.1.7.4). Die Toleranzentwicklung gegenüber Morphin kann in Ratten durch die tägliche Gabe von Morphin gut nachgestellt werden. Interessanterweise konnte die parallele rMrgC-Stimulation, entweder durch tägliche Gabe kleiner Dosen BAM8-22, oder durch die intermittierende Gabe von BAM8-22 oder γ_2 -MSH an jedem zweiten Tag, die Entwicklung der Morphintoleranz inhibieren (Chen, 2010, Jiang, 2006). Auf zellulärer Ebene wurde die Inhibition der Morphin-induzierten PKC γ -Induktion in Neuronen des spinalen Hinterhorns als molekulare Ursache dafür identifiziert (Chen, 2010). Diese Inhibition ging zugleich mit einer verminderten Morphin-induzierten Expression der NO-Synthetase und von CGRP in Neuronen des Spinalganglions und des spinalen Hinterhorns einher.

Insgesamt kann damit eine Modulation der Nozizeption durch MrgC-Rezeptoren als gesichert angesehen werden. Allerdings bestehen gegensätzliche Daten, die auf pro-algetische oder analgetische Funktionen hindeuten. Die genauen Regulationsprozesse und molekularen Determinanten, die zur Entwicklung der einen oder anderen Funktion führen, konnten bislang allerdings noch nicht ermittelt werden.

3.3 Die Subfamilie der MrgX-Rezeptoren

3.3.1 Allgemeines und Mitglieder der MrgX-Subfamilie

Die MrgX-Subfamilie existiert weder in Mäusen noch in Ratten, wurde jedoch in Menschen, Rhesusaffen und Makaken nachgewiesen und muss daher als Primaten-spezifisch angesehen werden (vgl. Abschnitt 3.2.2). Das Auftreten von Primaten- oder sogar human-spezifischen Proteinen sollte entscheidend an der Entwicklung spezifischer Eigenschaften dieser Spezies beteiligt gewesen sein, insbesondere wenn sich die Funktion dieser Proteine im Laufe der Evolution durch positive Selektion entwickelte (Vallender, 2004). Eine genaue Analyse der hMrgX-Rezeptoren ergab, dass sich diese Rezeptoren, im Gegensatz zu vielen anderen GPCR, unter extrem starker positiver Selektion entwickelten (Choi, 2003, Fatakia, 2011). Diese Selektion führte zur Konservierung nicht-synonymer mutagener Ereignisse innerhalb der extrazellulären Domänen (Choi, 2003) und in Bereichen der transmembranären Domänen, die an der Ligandenbindung beteiligt sind (Fatakia, 2011), während die intrazellulären Domänen sowie die anderen Bereiche der transmembranären Domänen keinem Selektionsdruck unterlagen. Aufgrund dieser Befunde wird davon ausgegangen, dass die Affinität konservierter Liganden oder die Spezifität neuer Liganden für MrgX-Rezeptoren verändert wurden, um die nozizeptiven Eigenschaften von Primaten im Vergleich zu anderen Säugetieren an neue Anforderungen anzupassen.

Der positive evolutive Selektionsdruck führte neben der Konservierung nicht-synonymer mutagener Ereignisse zur Entstehung einer gesamten Subfamilie mit unterschiedlichen hMrgX-Rezeptoren (Abbildung 3.7). Sie setzt sich laut Dong aus vier exprimierten Isoformen zusammen (Dong, 2001). Lembo konnte zusätzlich drei weitere Nozizeptor-spezifische Rezeptoren identifizieren, der hMrgX2-Rezeptor aus der Arbeit von Dong wurde allerdings nicht als Nozizeptor-spezifischer GPCR ermittelt (Lembo, 2002). Schließlich wurden zwei weitere hMrgX-Gene, teilweise mit nur wenigen veränderten Aminosäuren, identifiziert (Burstein, 2006). Die jeweilige Identität der verschiedenen Rezeptoren aus diesen drei Arbeiten ist in Tabelle 3.4 zusammenfassend dargestellt.

Der hMrgX1-Rezeptor ist bereits in einigen Arbeiten untersucht worden, die ermittelten Daten sollen allerdings im Abschnitt 3.3.2 zusammenhängend dargestellt werden.

Während für den hMrgX2-Rezeptor zumindest einige Befunde vorliegen, ist über die anderen hMrgX-Rezeptoren praktisch nichts bekannt. Zusätzlich zur Expression in Spinalganglienneuronen wird der hMrgX2-Rezeptor, im Unterschied zu den anderen hMrgX-Isoformen, in weiteren Geweben exprimiert. So wurden hMrgX2-

Transkripte in ähnlicher Expressionsstärke im Hippocampus, Hoden und Darm sowie in der Haut und im Fettgewebe gefunden (Robas, 2003, Kamohara, 2005, Tatemoto, 2006). Die hMrgX2-Expression in der Haut könnte dabei möglicherweise in der Expression in Mastzellen vom Bindegewebstyp begründet liegen (Tatemoto, 2006). Außerdem konnte der hMrgX2-Rezeptor in chromaffinen Zellen des Nebennierenmarks nachgewiesen werden (Kamohara, 2005). Das Peptid Cortistatin-14 wurde als potenter Agonist des hMrgX2-Rezeptors identifiziert, der die Mobilisation von Ca^{2+} -Ionen über die Aktivierung von $\text{G}_{q/11}$ Proteinen vermittelt (Robas, 2003). Cortistatin-14 war bislang als Agonist der Somatostatinrezeptoren bekannt (Fukusumi, 1997). Robas schlägt allerdings vor, dass Cortistatin-14 über den hMrgX2-Rezeptor zur Induktion von Tiefschlaf führt, da dieser Rezeptor im Hippocampus nachgewiesen wurde und Somatostatin keinen Tiefschlaf induziert. Aufgrund des relativ breiten Expressionsmusters des hMrgX2-Rezeptors wurden weitere Funktionen des Rezeptors vermutet. Tatsächlich konnte ermittelt werden, dass Proadrenomedullin-Peptide ebenso wie Cortistatin-14 den hMrgX2-Rezeptor im Nebennierenmark hoch-affin binden können und in einer Inhibition von AC sowie einer Ca^{2+} -Mobilisation resultieren (Kamohara, 2005). Da bislang kein Proadrenomedullinrezeptor identifiziert werden konnte, wird postuliert, dass die hypotensive Wirkung von Proadrenomedullin über eine hMrgX2-vermittelte Inhibition der Freisetzung von Adrenalin aus chromaffinen Zellen vermittelt wird. Schließlich konnte dem hMrgX2-Rezeptor eine wichtige Funktion bei der Degranulation von Mastzellen zugewiesen werden, indem gezeigt werden konnte, dass verschiedene degranulierende Liganden, beispielsweise sog. basische Sekretoge oder das anti-bakteriell wirkende mature Cathelicidin LL-37, ihre Wirkung über den hMrgX2-Rezeptor entfalten (Kashem, 2011, Subramanian, 2011a, Subramanian, 2011b, Tatemoto, 2006).

Tabelle 3.4: Überblick über die Subfamilie der humanen MrgX/SNSR-Rezeptoren

Dong, 2001	Lembo, 2002	Burstein, 2006
MrgX1	SNSR4	MrgX1-1 (-2 existiert zusätzlich)
MrgX2		MrgX2
MrgX3	SNSR1	MrgX3-1 (-2 existiert zusätzlich)
MrgX4	SNSR6	MrgX4-1
	SNSR5	MrgX4-2
	SNSR2	MrgX6
	SNSR3	MrgX7

3.3.2 Der hMrgX1-Rezeptor

3.3.2.1 Expressionsprofil des hMrgX1-Rezeptors

Der hMrgX1-Rezeptor wird spezifisch in Neuronen des *Ganglion trigeminale* und der Spinalganglien exprimiert (Dong, 2001, Lembo, 2002). Die Neurone dieser Ganglien können zunächst grundlegend nach dem Durchmesser ihres Somas eingeteilt werden. Dabei findet sich der hMrgX1-Rezeptor spezifisch in den Neuronen mit kleinem Durchmesser, die für die Schmerzwahrnehmung verantwortlich sind und daher als Nozizeptoren bezeichnet werden (Lembo, 2002, Zhang, 2005a).

Diese Gruppe von Neuronen kann weiter subklassifiziert werden, indem distinkte Markerproteine nachgewiesen werden. Zum einen existiert die Klasse der peptidergen Nozizeptoren, die aufgrund ihrer Expression der Neuropeptide CGRP und SP benannt wurden. Zum anderen grenzt man die nicht-peptidergen Nozizeptoren davon ab, welche sich durch die fehlende CGRP/SP-Expression auszeichnen und zusätzlich das Isolektin B4 binden (Snider, 1998). Ein weiterer typischer Marker der nicht-peptidergen Nozizeptoren ist der ionotrope, purinerge P2X3-Rezeptor (Snider, 1998). Die Unterteilung der Nozizeptoren in diese beiden Gruppen ist nicht nur phänotypisch zu begründen, sondern sie resultiert entwicklungsbiologisch aus der Abhängigkeit von verschiedenen Neurotrophinen (Woolf, 2007). So benötigen die peptidergen Nozizeptoren eine ständige Stimulation mit *nerve growth factor*, während die nicht-peptidergen Nozizeptoren von einer Stimulation mit *glial-derived neurotrophic factor* (GDNF) abhängen. Diesem Umstand liegt die distinkte Expression von Rezeptoren für die jeweiligen Neurotrophine, Tropomyosinrezeptorkinase A bzw. *cellular receptor tyrosin-kinase* in Verbindung mit den GDNF-Familie Ko-Rezeptoren $\alpha 1$ und $\alpha 2$, zu Grunde (Woolf, 2007). Bislang ist die genaue Eingruppierung des hMrgX1-Rezeptors in eine der beiden Gruppen nicht möglich gewesen. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Spinalganglienneurone aus *Macaca fascicularis*, die den MrgX2-Rezeptor exprimieren, entweder auch SP ko-exprimieren oder durch Isolektin B4 gebunden werden (Zhang, 2005a). Somit kommt der MrgX2-Rezeptor in beiden Gruppen nozizeptiver Neurone vor. Interessanterweise ko-lokalisierte der MrgX2-Rezeptor in dieser Studie auch mit dem TRPV1. Im Unterschied zu den Gegebenheiten in Makaken ist die Expression der MrgA- und MrgC-Isoformen in Mäusen und Ratten auf die nicht-peptidergen Nozizeptoren beschränkt (Dong, 2001, Lembo, 2002, Zylka, 2003), was möglicherweise auf zusätzliche Funktionen in Primaten hindeuten könnte.

Vor kurzem konnten Transkripte des hMrgX1-Rezeptors in Mastzellen des Bindegewebstyps nachgewiesen werden (Subramanian, 2011b, Tatemoto, 2006). Allerdings blieb es bislang nur beim Nachweis von Transkripten des hMrgX1-Rezeptors. So konnte in Mastzellen weder das Vorhandensein des hMrgX1-Proteins,

noch eine hMrgX1-abhängige Signaltransduktionskaskade durch den Einsatz spezifischer Liganden (vgl. Abschnitt 3.3.2.2) nachgewiesen werden.

3.3.2.2 Liganden des hMrgX1-Rezeptors

Der hMrgX1-Rezeptor wurde 2002 von Lembo und Kollegen deorphanisiert (Lembo, 2002). In HEK293-Zellen, die den hMrgX1-Rezeptor rekombinant exprimierten, wurden durch eine Stimulation mit BAM-Peptiden Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern freigesetzt. Damit scheint es pharmakologische Gemeinsamkeiten mit den MrgC-Rezeptoren, nicht jedoch mit den MrgA-Rezeptoren aus Maus und Ratte zu geben (vgl. Abschnitt 3.2.3). Als EC_{50} -Wert für die BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisation wird 14 nM angegeben (Lembo, 2002). Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass das genutzte zelluläre System ein chimäres $\text{G}\alpha_q$ Protein ko-exprimierte, bei dem die fünf C-terminalen Aminosäuren gegen jene aus dem $\text{G}\alpha_{i2}$ Protein ausgetauscht wurden ($\text{G}\alpha_{qi5}$). Dieses chimäre G-Protein wurde eingesetzt, um Ca^{2+} -Signale von $\text{G}_{i/o}$ -gekoppelten Rezeptoren sensitiver messen zu können. Allerdings ist dieses Vorgehen eher für Rasteransätze geeignet und kann in der Verbesserung eines gegebenen EC_{50} -Wertes resultieren (Florio, 1989, Haga, 1986). Vor allem der hMrgX1-spezifische Ligand BAM8-22, welcher Opioidrezeptoren nicht binden und aktivieren kann, wurde seit 2002 in einer Vielzahl von Arbeiten als spezifischer hMrgX1-Agonist eingesetzt (Breit, 2006a, Burstein, 2006, Gales, 2005, Kashem, 2011, Liu, 2009, Shemesh, 2008, Sikand, 2011, Subramanian, 2011b, Tatemoto, 2006, Wilson, 2011, Kunapuli, 2006, Malik, 2009, Schmidt, 2009).

Zusätzlich zu BAM-Peptiden wurde in $\text{G}\alpha_{qi5}$ -positiven HEK293-Zellen eine agonistische Wirkung von γ_2 -MSH am hMrgX1-Rezeptor beobachtet, allerdings zeigte der ermittelte EC_{50} -Wert eine etwa 30-fache Abnahme gegenüber BAM8-22 (Lembo, 2002). Dies stimmt auch damit überein, dass die Aminosäuresequenz RF(Y)-Amid bzw. RF(Y)G am C-Terminus eine Peptides *per se* nicht ausreichte, um den hMrgX1-Rezeptor zu aktivieren, während diese Konsensussequenz für die Aktivierung von MrgC-Rezeptoren ausreichend war (vgl. Abschnitt 3.2.3). Nach dieser ersten Erwähnung fand γ_2 -MSH folglich auch keine weitere Anwendung bei der Analyse von Funktionen des hMrgX1-Rezeptors.

Neben dem endogen vorkommenden Peptid BAM8-22 wurde ein tetrazyklisches Benzimidazol als nicht-peptiderger hMrgX1-Agonist beschrieben, dessen EC_{50} -Wert mit ~200 nM angegeben wird (Malik, 2009). Außerdem erschienen zwei Arbeiten, die strukturell distinkte hMrgX1-Antagonisten, zum einen zyklische Dimere des C-terminalen Endes von γ_2 -MSH und zum anderen Azabizyklooctane, identifizieren konnten (Kunapuli, 2006, Schmidt, 2009). Diese Verbindungen wurden von den pharmazeutischen Konzernen ACADIA Pharmaceuticals, Merck oder AstraZeneca

entwickelt und sind bislang nicht kommerziell erhältlich. Schließlich wurde auch postuliert, dass das Anti-Malaria-Medikament Chloroquin den hMrgX1-Rezeptor aktivieren kann (Liu, 2009). Diese Daten konnten allerdings bisher nicht bestätigt werden, was möglicherweise daran liegt, dass die Studie den ratiometrischen Ca^{2+} -Fluoreszenzfarbstoff Fura2 (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2) nutzte, obwohl Chloroquin selektiv bei einer der beiden Anregungswellenlängen des Fura2 absorbiert (Joshi, 2011). Zusätzlich war die Potenz (EC_{50} -Wert von $\sim 300 \mu\text{M}$) deutlich schlechter als jene von BAM8-22 und die intrinsische Effizienz von Chloroquin, bezogen auf BAM8-22, betrug nur $\sim 0,4$ und deutet damit an, dass Chloroquin ein niedrig-affiner, partieller Agonist am hMrgX1-Rezeptor sein könnte.

3.3.2.3 Zelluläre Signalwege des hMrgX1-Rezeptors

Auf zellulärer Ebene sind bislang nur wenige Zielstrukturen des hMrgX1-Rezeptors und deren zu Grunde liegende Signaltransduktionswege identifiziert worden (Abbildung 3.8). Dabei stammen alle Daten aus rekombinanten Expressionssystemen und stimmen darin überein, dass die Aktivierung des hMrgX1-Rezeptors in einer Stimulation der enzymatischen Aktivität von PLC- β -Isoformen resultiert (Breit, 2006a, Burstein, 2006, Lembo, 2002, Liu, 2009, Wilson, 2011, Schmidt, 2009, Shemesh, 2008). Dies wiederum führt zur Spaltung von PIP_2 in DAG und IP_3 (Breit, 2006a), wobei letzteres über die Aktivierung von IP_3R zur Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus intrazellulären Speichern führt (vgl. Abschnitt 3.1.5).

Prinzipiell könnte die PLC- β -Aktivierung über $\text{G}_{\alpha_{q/11}}$ -Untereinheiten oder $\text{G}_{\beta\gamma_{i/o}}$ -Komplexe vermittelt werden. Unter Einsatz des $\text{G}_{i/o}$ -Inhibitors PTX konnte keine Veränderung der Ca^{2+} -Mobilisation festgestellt werden, so dass zunächst von einer reinen $\text{G}_{q/11}$ -Kopplung des hMrgX1-Rezeptors in HEK293-Zellen ausgegangen wurde (Lembo, 2002). In anderen Arbeiten wird dies bestätigt und zusätzlich eine Kopplung des hMrgX1-Rezeptors an $\text{G}_{i/o}$ -Proteine postuliert (Gales, 2005, Burstein, 2006, Chen, 2004). Als $\text{G}_{i/o}$ -abhängig regulierte Prozesse wurde eine basale proliferative Aktivität des hMrgX1-Rezeptors nach Expression in 3T3-Fibroblasten (Burstein, 2006) bzw. die Inhibition spannungsabhängiger Ca^{2+} -Kanäle nach Expression in verschiedenen Neuronenkulturen (Chen, 2004) ermittelt. Außerdem ist die Inhibition von M-Typ K^+ -Kanälen beschrieben worden, die jedoch strikt von $\text{G}_{q/11}$ Proteinen abhing (Chen, 2004).

Damit kann zusammenfassend konstatiert werden, dass der hMrgX1-Rezeptor die Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen vermittelt und die Aktivität von depolarisierenden oder hyperpolarisierenden Ionenkanälen beeinflussen kann. Die genauen Signalwege sind jedoch noch nicht endgültig determiniert worden. Allerdings erscheint die Aktivierung von $\text{G}_{q/11}$ Proteinen unumstritten, während eine Beteiligung von $\text{G}_{i/o}$ Proteinen nur in bestimmten Expressionssystemen diskutiert wird.

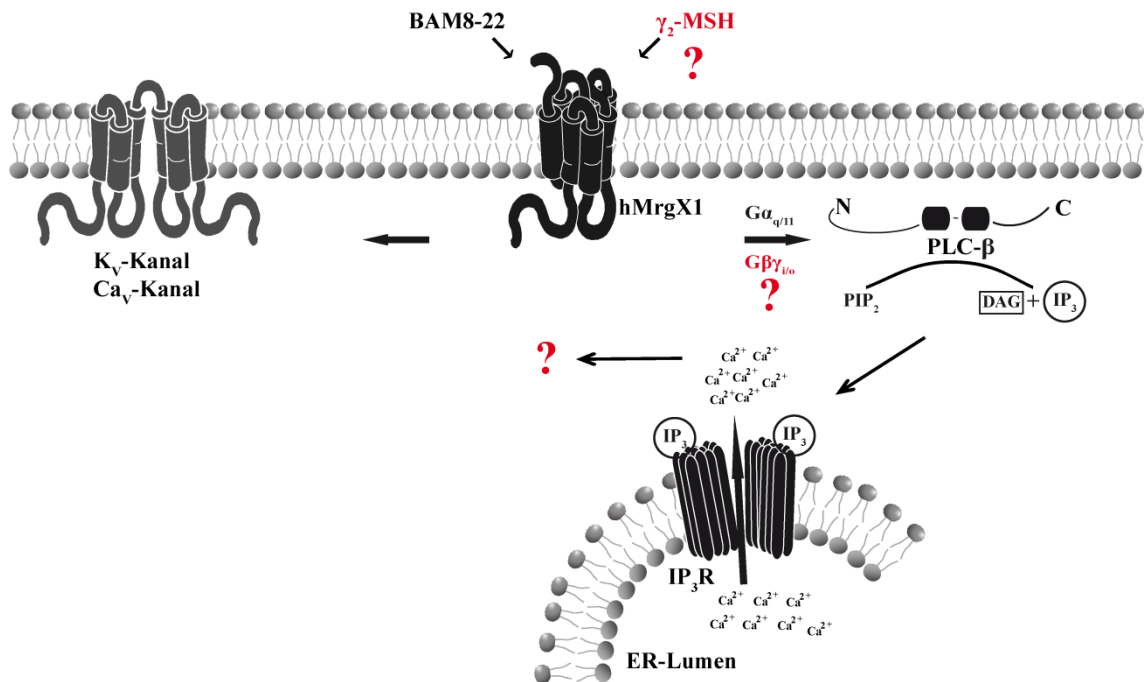


Abbildung 3.8: Schematische Darstellung der bislang bekannten hMrgX1-induzierten Signalwege
hMrgX1-induzierte Signalwege, deren molekulare Signaltransduktionskomponenten als etabliert gelten, sind in schwarz bezeichnet, während unklare Befunde in rot mit einem Fragezeichen markiert wurden. Zum einen konnte eine hMrgX1-induzierte Modulation von K_v- und Ca_v-Kanalaktivitäten und zum anderen eine Aktivierung der PLC-β nach Stimulation des hMrgX1-Rezeptors beobachtet werden. Die Beteiligung von Gα_{q/11}-Proteinen an letzterem Prozess gilt als sicher, während möglicherweise zusätzlich Gβγ_{i/o}-Komplexe involviert sind. BAM8-22 ist als selektiver Agonist des hMrgX1-Rezeptors akzeptiert, zusätzlich wurde außerdem γ₂-MSH vorgeschlagen. Nach der PLC-β-Aktivierung konnten erhöhte intrazelluläre Ca²⁺-Konzentrationen ermittelt werden, deren funktionelle Bedeutung jedoch zurzeit unbekannt ist.

3.3.2.4 Physiologische Funktionen des hMrgX1-Rezeptors

Aufgrund seiner selektiven Expression in nozizeptiven Spinalganglienneuronen (der potentiellen hMrgX1-Expression in Mastzellen wurde wegen der fehlenden Validierung der Proteinexpression bislang keine physiologische Funktion zugeordnet) wird von einer bedeutenden Rolle des hMrgX1-Rezeptors für die Nozizeption ausgegangen (Lembo, 2002).

Klassischerweise werden für die Analyse der Funktion eines humanen Proteins, das selektiv in schwer zugänglichen Geweben wie dem Nervensystem exprimiert wird, zelluläre Expressionssysteme oder immortalisierte, endogen exprimierende Zelllinien genutzt. Weiterhin wird häufig versucht, entsprechende Untersuchungen an homologen Proteinen anderer Spezies durchzuführen, in denen das exprimierende Gewebe aus ethischen Gründen besser zugänglich ist. Im Falle des hMrgX1-Rezeptors konnten homologe Gene nur in Primaten identifiziert werden (Burstein, 2006, Dong, 2001, Lembo, 2002, Zhang, 2005a), allerdings wurden auch in diesen Tieren bislang keine funktionellen Untersuchungen des MrgX1-Rezeptors durchgeführt. Dies wäre sicherlich auch als ethisch problematisch anzusehen und mit einem enormen Verbrauch an

Ressourcen verbunden. Indes kommt in Nagetieren der MrgC-Rezeptor vor, welcher ebenfalls selektiv in nozizeptiven Spinalganglienneuronen exprimiert wird (Han, 2002, Lembo, 2002). Weiterhin scheint es ein überlappendes Ligandenspektrum zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren zu geben (Grazzini, 2004, Han, 2002, Lembo, 2002), obwohl die konsequente pharmakologische Gegenüberstellung noch zu leisten ist. Schließlich resultiert die Aktivierung von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren in einer Ca^{2+} -Mobilisation aus intrazellulären Speichern. Daher wurde versucht, durch die Analyse der MrgC-Funktion in Mäusen und Ratten Daten zu generieren, die belastbar auf die hMrgX1-Funktion im Menschen übertragen werden sollten (Chang, 2009, Chen, 2010, Chen, 2006, Chen, 2008, Chen, 2012, Grazzini, 2004, Hager, 2008, Hong, 2004, Ndong, 2009, Zeng, 2004, Cai, 2007a, Cai, 2007b). Entsprechend der selektiven Expression konnte nach Gabe von MrgC-Agonisten eine Modulation der Nozizeption nachgewiesen werden (vgl. Abschnitt 3.2.5), so dass umgehend postuliert wurde, dass der hMrgX1-Rezeptor eine interessante Zielstruktur für die humane analgetische Therapie darstellt. Je nach der Art der gemessenen Schmerzmodulation in Nagetieren wurden Agonisten oder Antagonisten des hMrgX1-Rezeptors als entsprechende Wirkstoffe vorgeschlagen. Ob MrgC-Rezeptoren in Nagetieren wirklich ein valides Modell für den hMrgX1-Rezeptor darstellen, ist jedoch weiterhin umstritten (Burstein, 2006, Chen, 2004), da es sich um nicht-homologe Proteine handelt und insbesondere keine Daten zur vergleichenden funktionellen Analyse von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren zugänglich sind.

Einen möglicherweise entscheidenden Anteil zum Verständnis der hMrgX1-Funktion konnte 2011 im Laufe der Erstellung dieser Arbeit von Sikand und Kollegen geliefert werden (Sikand, 2011). Sie applizierten im Rahmen einer humanen Studie BAM8-22 in die Haut von 15 Probanden. Als Applikationsweg nutzten sie nadelförmige Anhängsel von Blättern der subtropischen Kletterpflanze *Mucuna pruriens* (Juckbohne), deren innerer Hohlraum durch Eintauchen mit BAM8-22 gefüllt wurde. Dieser Applikationsweg wurde ursprünglich als besonders geeignet identifiziert, um juckende, sog. pruritogene Substanzen in die Haut zu applizieren (Sikand, 2009). Es zeigte sich, dass die Probanden die Applikation von BAM8-22 als juckend, stechend, kribbelnd und brennend (schmerzhaft und nicht schmerzhaft) empfanden. Außerdem konnte nach der BAM8-22-Applikation eine mechanische Hyperalgesie verzeichnet werden. Die beschriebenen Empfindungen werden von den Autoren als hMrgX1-vermittelt angesehen, da das C-terminal trunktierte BAM8-18 keine Effekte auslöste und bereits bekannt war, dass BAM8-18 den hMrgX1-Rezeptor in zellulären Expressionssystemen nicht aktivieren kann (Lembo, 2002). Der gewählte Applikationsweg neigt allerdings einseitig dazu, pruritogene Empfindungen auszulösen. So diskutieren die Autoren, dass die etablierte chemische Noxe CAP, ein Agonist des TRPV1 (Caterina, 1997), nach Applikation mit nadelförmigen Anhängseln der

Juckbohne sehr ähnliche Empfindungen auslöste wie BAM8-22, bei anderen Applikationswegen aber in erster Linie als schmerzhaft empfunden wird (Sikand, 2011, Sikand, 2009). Daher kommen die Autoren letztlich zu dem Schluss, dass der hMrgX1-Rezeptor im Menschen schmerzhafte Empfindungen auslösen kann.

Dieser Befund steht damit in guter Übereinstimmung mit den ermittelten pro-algetischen Funktionen der MrgC-Rezeptoren und mit der Expression des hMrgX1-Rezeptors in nozizeptiven Spinalganglienneuronen. Allerdings konnten die zu Grunde liegenden Signaltransduktionswege nicht identifiziert werden. Außerdem muss letztlich geklärt werden, ob eine Stimulation des hMrgX1-Rezeptors auch nach anderen Applikationswegen Schmerzen auslöst oder möglicherweise zusätzliche analgetische Funktionen ausgeübt werden. Schließlich ist die Identität von molekularen Zielstrukturen des hMrgX1-Rezeptors, die auf eine pro- oder analgetische Funktion hinweisen könnten, weiterhin unbekannt, könnte aber einen Beitrag zum besseren Verständnis der hMrgX1-Funktion liefern.

3.4 Zielsetzung der Arbeit

Der hMrgX1-Rezeptor entwickelte sich unter hohem positivem Selektionsdruck, wird selektiv in nozizeptiven Spinalganglienneuronen exprimiert und sein spezifischer Agonist BAM8-22 löst Schmerzreaktionen im Menschen aus, so dass der hMrgX1-Rezeptor eine interessante molekulare Zielstruktur für zukünftige, potentiell nebenwirkungsarme analgetische Wirkstoffe darstellen könnte. Die Liganden-abhängige Desensibilisierung sowie pro-algetische Signalwege des hMrgX1-Rezeptors sind allerdings bislang nicht analysiert worden.

Da der MrgX1-Rezeptor nur in Primaten vorkommt und daher schwierig zu analysieren ist, wurde versucht, hMrgX1-Funktionen durch die Analyse der nah verwandten, aber nicht-homologen MrgC-Rezeptoren in Mäusen und Ratten zu ermitteln. Diese Vorgehensweise ist allerdings umstritten, da vergleichende pharmakodynamische Daten zu hMrgX1- bzw. MrgC-Rezeptoren bislang nicht vorliegen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher zunächst zelluläre Modellsysteme für die funktionelle Untersuchung von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren etabliert, um vergleichende Ligandenprofile zu erstellen und die Liganden-abhängige Desensibilisierung zu untersuchen. Die ermittelten pharmakodynamischen Unterschiede sprachen gegen die Verwendung von Nagetieren als Modellsystem zur Analyse der hMrgX1-Funktion. Daher wurden verschiedene, von Spinalganglienneuronen abgeleitete, rekombinante Expressionsmodelle genutzt, um neue pro-algetische Signalwege des hMrgX1-Rezeptors zu etablieren. Um einen Beitrag zur akuten Nozizeption zu ermitteln, sollte die funktionelle Interaktion des hMrgX1-Rezeptors mit dem TRPV1-Ionenkanal untersucht werden. Außerdem wurde die eventuelle Beteiligung des hMrgX1-Rezeptors an der peripheren Schmerzchronifizierung untersucht. Dafür wurde die hMrgX1-vermittelte Regulation der Genexpression im Allgemeinen, sowie die Induktion etablierter, chronisch-nozizeptiver Markerproteine im Besonderen analysiert. Im Kontext der peripheren Schmerzchronifizierung sollte darüber hinaus die Bedeutung des hMrgX1-Rezeptors in Mastzellen für deren funktionelle Interaktion mit Nozizeptoren etabliert werden.

4 Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Geräte

Apparatur zum Immunoblot	Werkstatt Walther-Straub-Institut, München
Bakterieninkubator	Heraeus, Hanau
Bakterienscüttler MaxQ 6000	Thermo, Dreieich
ChemiSmart 5000	Peqlab, Erlangen
DNA-Gelelektrophoresezubehör	Peqlab, Erlangen
Druckejektor MPCU-3	Lorenz, Katlenburg-Lindau
Durchflusszytometer CyAn™ ADP	Beckman Coulter, Krefeld
Elektroporator Neon®	Invitrogen, Darmstadt
Feinwaage HR-202	Bachofer, Reutlingen
Fluoreszenzmikroskop IX-71	Olympus, Hamburg
Fluoreszenztisch TCP-26.LMX	Vilber, Eberhardzell
Geldokumentationssystem	Peqlab, Erlangen
Kühlzentrifuge Fresco 21	Heraeus, Hanau
Lichtmikroskop CKX31	Olympus, Hamburg
LightCycler 480™	Roche, Mannheim
Magnetrührer Barnstead Thermolyne	Thermo, Dreieich
Mikroliterpipetten	Peqlab, Erlangen
Mikromanipulator SM-5	Luigs-Neumann, Ratingen
Mikromanipulator Patchman NP-2	Eppendorf, Hamburg
Mikroskopkamera iXON+ DU885	Andor, Belfast, Nord-Irland
Monochromator Polychrom 5000	Till Photonics, Gräfelfing
Neubauer-Zählkammer	Brand, Wertheim
Patch Clamp Verstärker EPC10	Heka Elektronik, Lambrecht
PCR-Gerät Primus 25 advanced	Peqlab, Erlangen
pH-Meter FE20	Mettler Toledo, Gießen
Photometer BioPhotometer Plus	Eppendorf, Hamburg
Pipettierhilfe	Hirschmann Laborgeräte, Eberstadt
Plattenlesegerät FluoStar Omega	BMG Labtech, Offenburg

Material und Methoden

Protein-Gelelektrophoresezubehör	Bio-Rad, München
schwingungsgedämpfter Tisch 63-53	TMC, Peabody, USA
Spannungsquelle EV 231	Peqlab, Erlangen
Sterilbank HERAsafe KS18	Thermo, Dreieich
Szintillationszähler WS1414	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim
Taumelschüttler Polymax 1040	Heidolph, Schwabach
Thermoschüttler TS-100	Peqlab, Erlangen
Ultraschallstab	Werkstatt Walther-Straub-Institut, München
Vortexer MS3 basic	Ika, Staufen
Waage EG-N	Kern, Balingen
Wasserbad HI 1210	Memmert, Schwabach
Zellkulturinkubator HeraCell 240	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Labofuge 400	Heraeus, Hanau
Zentrifuge Pico 17	Heraeus, Hanau

4.1.2 Verbrauchsmaterialien

Borosilikat-Kapillaren mit Filament	Science Products, Hofheim
Mikroschraubröhre	Sarstedt, Nürnberg
Nitrozellulosemembran 0,45 µm	Whatman GmbH, Dassel
Pasteurpipetten	VWR, Darmstadt
Petrischalen, 100 mm	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Sarstedt, Nürnberg
Reagenz- und Zentrifugenröhren	Sarstedt, Nürnberg
Szintillationsgefäße, 20 mL	Packard, Groningen, Niederlande
serologische Pipetten	Sarstedt, Nürnberg
Zellkulturflaschen, 175 cm ²	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur 6-Loch-Platten	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur 12-Loch-Platten	Greiner, Frickenhausen
Zellkultur 24-Loch-Platten	Sarstedt, Nürnberg
Zellkultur 96-Loch-Platten	Sarstedt, Nürnberg
96-Loch-Platten, weißer Boden/Rand	Greiner, Frickenhausen

4.1.3 Reagenzien

BAM8-22	Biotrend, Köln
BCTC	Biomol, Hamburg
BIM-X	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Bradykinin	Biotrend, Köln
CCL2	Preprotech, Hamburg
CAP	Fluka, Deisenhofen
Carbachol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
CID-755673	Tocris, Bristol, Großbritannien
Coelenterazin H	Biaffin, Kassel
Cyclosporin A	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dynorphin-A	Bachem, Weil am Rhein
Dynorphin-14	Metabion, Martinsried
Forskolin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Fura2-AM	Fluka, Deisenhofen
Gallein	Calbiochem, Darmstadt
Luziferasesubstrat	Promega, Mannheim
LY294002	Biomol, Hamburg
NDGA	Tocris, Bristol, Großbritannien
NPAF	Bachem, Weil am Rhein
NPFF	Bachem, Weil am Rhein
o-PD ELISA-Substrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
PD184352	Selleck Chemicals, Houston (TX), USA
PMA	Biotrend, Köln
PP2	Biotrend, Köln
Sybr Green I Mastermix	Roche, Mannheim
Tapsigargin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
U73122	Calbiochem, Darmstadt
γ -MSH	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
[³ H]-Adenin	PerkinElmer, Rodgau-Jügesheim

Alle anderen Chemikalien wurden von Sigma-Aldrich, Deisenhofen, oder Carl-Roth, Karlsruhe, bezogen.

4.1.4 Antikörper

4.1.4.1 Primärantikörper (nicht konjugiert)

Antigen	Donorspezies	Applikation	Verdünnung	Hersteller
Erk-2	Kaninchen	Immunoblot	1:10000	Santa Cruz, Heidelberg
p-ELK-1	Kaninchen	Immunoblot	1:1000	Cell Signaling, Damvers (MA)
p-Erk-1/2	Maus	Immunoblot	1:5000	Santa Cruz, Heidelberg
Xpress-Epitop	Maus	ELISA	1:2000	Invitrogen, Darmstadt

4.1.4.2 Primärantikörper (Allophycocyanin-konjugiert)

Antigen	Donorspezies	Applikation	Verdünnung	Hersteller
CCR2	Ratte	Durchflusszytometrie	1:100	R&D Systems, Wiesbaden
Isotyp zu CCR2 (IgG _{2b})	Ratte	Durchflusszytometrie	1:100	R&D Systems, Wiesbaden

4.1.4.3 Sekundärantikörper (Meerrettich-Peroxidase-konjugiert)

Antikörper	Verdünnung	Hersteller
Anti-Kaninchen-IgG	1:2000 - 10000	Bio-Rad, München
Anti-Maus-IgG	1:10000	Bio-Rad, München

4.1.5 Molekularbiologie

Reagenz	Hersteller
Agarosegeleextraktionskit	Fermentas, St. Leon-Rot
Erststrang cDNA-Synthesekit H-	Fermentas, St. Leon-Rot
Desoxyribonukleotide	Fermentas, St. Leon-Rot
Größenstandard: <i>GeneRuler 1kb DNA ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
Größenstandard: <i>PageRuler prestained protein ladder</i>	Fermentas, St. Leon-Rot
DNA-Probenpuffer	Fermentas, St. Leon-Rot
Plasmidaufreinigungskit	Machery-Nagel, Düren
<i>Pfu</i> DNA-Polymerase	Fermentas, St. Leon-Rot
Primer	Metabion, Martinsried
<i>QuickChange</i> TM Site-directed Mutagenesekit	Stratagene, Waldbronn

Restriktionsenzyme

Fermentas, St. Leon-Rot

T4 DNA-Ligase

Fermentas, St. Leon-Rot

4.1.6 Zellen und Nährmedien

HEK293-Zellen, humane embryonale Nierenepithelzellen, werden seit mehr als 30 Jahren in der biomedizinischen Forschung verwendet, um grundlegende Signaltransduktionsprozesse zu untersuchen (Graham, 1977, Thomas, 2005). Als Nährmedium von HEK293-Zellen wurde *Dulbecco's modified Eagle's medium* (25 mM Glukose) mit 10 % *fetal calf serum* (FCS), Penicillin (5000 U/ml) und Streptomycin (5000 µg/ml) genutzt.

COS7-Zellen stellen Nierenepithelzellen der grünen Meerkatze dar, die durch die Infektion mit dem *Simian Vacuolating Virus 40* (SV40) immortalisiert worden sind, daher das *large T antigen* tragen und somit zur extrachromosomalen Replikation von Plasmid-DNA mit SV40-Promotern befähigt sind (Jensen, 1964). COS7-Zellen wurden aufgrund ihres sehr geringen Expressionsniveaus von β -Arrestinen als β -Arrestin-defizientes Zellsystem eingesetzt (Menard, 1997, Zhang, 1997). Das oben beschriebene Nährmedium von HEK293-Zellen wurde in der gleichen Zusammensetzung für COS7-Zellen genutzt.

Neben diesen beiden klassischen Zellmodellen zur grundlegenden Untersuchung von GPCR wurden, aufgrund der spezifischen Expression der Mrg-Rezeptoren in Spinalganglienneuronen, verschiedene Zelllinien eingesetzt, die von solchen Neuronen abgeleitet worden sind. F11-Zellen wurden durch die Fusion von embryonalen Spinalganglienneuronen der Ratte (E13 bis E14) mit der murinen Neuroblastom-Zelllinie N18TG2 generiert (Platika, 1985b). N18TG2-Zellen tragen einen Gendefekt in der Hypoxanthin-Guanin-Phosphoribosyltransferase (HGPT). Unter Blockade der Dihydrofolat-Reduktase durch Aminopterin und gleichzeitiger Gabe von Hypoxanthin und Thymidin ist somit die Replikation nur unter Einsatz der HGPT möglich. So kann durch Einsatz von Hypoxanthin, Aminopterin und Thymidin das Wachstum der parenteralen Neuroblastomzellen verhindert werden (Freshly, 1994). F11-Zellen stellen aufgrund ihrer Proteinausstattung ein gutes Modellsystem für nozizeptive Spinalganglienneurone dar, beispielsweise werden μ - und δ -Opioidrezeptoren, B2R oder Cannabinoid-1-Rezeptoren, aber auch spannungsabhängige Na^+ -Kanäle endogen in F11-Zellen exprimiert (Eijkelkamp, 2010, Fan, 1993, Fan, 1992, Fioravanti, 2008, Francel, 1987a, Francel, 1987b, Gaudioso, 2012, Jow, 2006, Jung, 2008a, Jung, 2008b, Li, 2004, McIlvain, 2006, Puttfarcken, 1997, Boland, 1991). Als Nährmedium von F11-Zellen wurde Ham's F-12 (2 mM Glutamin) mit 15 % FCS, Penicillin (5000 U/ml), Streptomycin (5000 µg/ml), Hypoxanthin (100 µM), Aminopterin (400 nM) und Thymidin (16 µM) eingesetzt.

Eine weitere neuronale Hybridzelllinie aus Spinalganglienneuronen und Neuroblastomzellen wurde 1990 von der Arbeitsgruppe um John Wood generiert und als ND-C-Zellen benannt (Wood, 1990). Im Unterschied zu F11 Zellen wurden zur Generierung der ND-C-Zellen Spinalganglienneurone von neonatalen Ratten mit den murinen N18TG2-Neuroblastomzellen fusioniert. ND-C-Zellen werden als zelluläres Modell für primäre Spinalganglienneurone verwendet (Rugiero, 2009). Das oben beschriebene Nährmedium von HEK293-Zellen wurde in der gleichen Zusammensetzung auch für ND-C-Zellen genutzt.

Neben F11- und ND-C-Zellen wurden in dieser Arbeit auch primäre Spinalganglienneurone der Ratte benutzt. Diese Zellen wurden von der Firma Innoprot (Derio, Spanien) bezogen. Innoprot isoliert die Zellen aus embryonalen Ratten (E18) und kultiviert sie für 5 Tage. Dann werden die Zellen kryokonserviert und bis zum Versand in flüssigem Stickstoff gelagert. Die primären Spinalganglienneurone wurden in NeuroBasal-Medium mit B-27-Supplement, Glutamin (2 mM), 10 % FCS, Penicillin (50 U/ml), Streptomycin (50 µg/ml) und Neomycin (100 µg/ml) gehalten.

Seit wenigen Jahren wird die endogene Expression des hMrgX1-Rezeptors in humanen Mastzellen postuliert (Kashem, 2011, Subramanian, 2011a, Subramanian, 2011b, Tatemoto, 2006). Dabei konnten Transkripte des hMrgX1-Rezeptors auch in der humanen Mastzelllinie LAD2 detektiert werden. LAD2-Zellen wurden für diese Arbeit freundlicherweise von Dr. Arnold S. Kirshenbaum (National Institutes of Health, Bethesda, USA) zur Verfügung gestellt. Sie wurden nach einer Knochenmarkspunktion eines Patienten mit Mastozytose als Zelllinie etabliert und weisen, im Gegensatz zu anderen humanen Mastzelllinien, einen relativ weit differenzierten Zustand auf (Kirshenbaum, 2003, Guhl, 2010). So proliferieren LAD2-Zellen nur unter anhaltender Stimulation von *c-kit* mit *stem cell factor* (SCF). Als Nährmedium für LAD2-Zellen wurde das Serum-freie StemPro34-Medium mit Nährstoffzusatz, Glutamin (2 mM), SCF (100 ng/ml), Penicillin (100 U/ml) und Streptomycin (100 µg/ml) genutzt.

Alle hier beschriebenen Medien und die entsprechenden Zusätze wurden von Invitrogen, Darmstadt, bezogen.

4.1.7 Bakterien

Es wurde der in der Molekularbiologie etablierte *Escherichia coli* (*E. coli*) Bakterienstamm DH5α verwendet.

4.1.8 Plasmide

4.1.8.1 Expressionskonstrukte von Mrg-Rezeptoren

Im Rahmen dieser Arbeit und einer vorangegangenen Diplomarbeit (Solinski, 2008) wurden verschiedene Expressionskonstrukte von Mrg-Rezeptoren generiert. Zum besseren Verständnis wird die Generierung entsprechender Expressionskonstrukte hier zusammenfassend dargestellt.

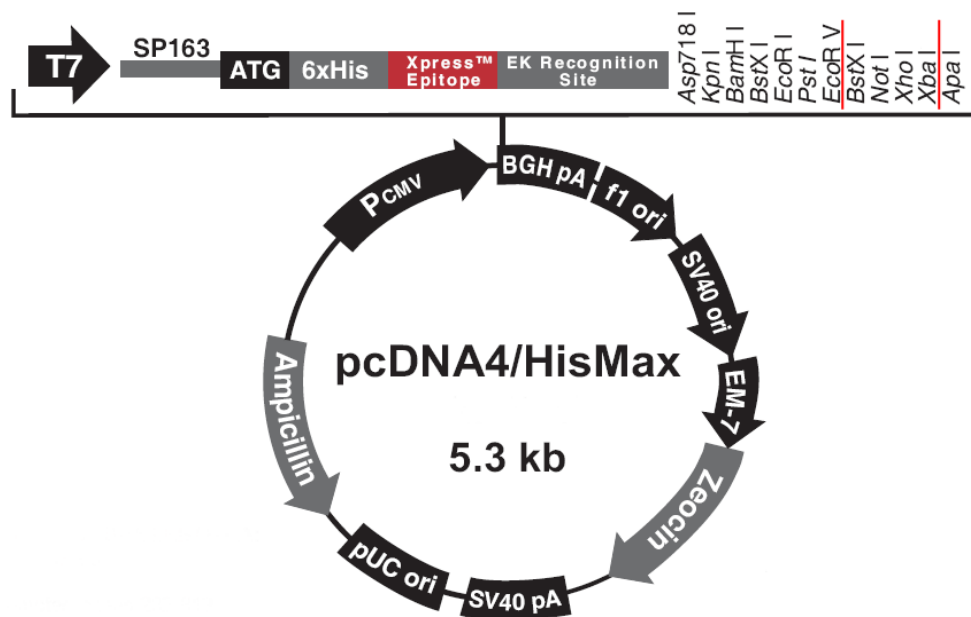


Abbildung 4.1: Schematischer Aufbau des pcDNA4-HisMax-Vektors

Dargestellt ist eine Modifikation der Darstellung des pcDNA4-HisMax-Vektors, veröffentlicht auf der Homepage der Firma Invitrogen. Die beiden Restriktionsenzyme, die für die Subklonierung der Mrg-Rezeptoren genutzt wurden, sind rot unterstrichen.

Da keine Antikörper gegen Mrg-Rezeptoren zur Verfügung stehen, wurden der hMrgX1-, der mMrgC- und der rMrgC-Rezeptor durch die Subklonierung in den pcDNA4-HisMax-Vektor an ihrem N-Terminus mit dem Xpress-Epitop fusioniert (vgl. Abbildung 4.1), so dass die rekombinante Expression des Fusionsproteins durch einen Anti-Xpress-Antikörper nachgewiesen werden kann. Die Gewinnung des Inserts für die entsprechenden Subklonierungen erfolgte mittels Polymerasekettenreaktion (*polymerase chain reaction*, PCR) und entsprechenden Stammvektoren als Matrize (vgl. Tabelle 4.1). Die Stammvektoren wurde von Dr. Andreas Breit (Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität München), Dr. David J. Anderson (Howard Hughes Medical Institute, California Institute of Technology, Pasadena, USA) und Mark J. Zylka (Neuroscience Center, University of North Carolina, Chapel Hill, USA) freundlicherweise zur Verfügung gestellt.

Bei der Synthese der Primer wurde darauf geachtet, die Restriktionsschnittstelle für XbaI in den 3'-Primer einzufügen. Das entsprechende Amplifikat aus der PCR wurde sodann mit dem Restriktionsenzym XbaI verdaut, um ein Insert zu erhalten, dass an seinem 5'-Ende keinen Einzelstrangüberhang aufweist, während an seinem 3'-Ende der XbaI-kompatible Überhang 5'-CTAG-3' entstanden ist. So ist eine gerichtete Ligation in den pcDNA4-HisMax-Vektor möglich, der mit dem *blut end* Restriktionsenzym EcoR5 sowie mit XbaI verdaut worden ist. Eine Übersicht über die verwendeten Primer für die Insert-PCR findet sich in Tabelle 4.1, dabei ist die neu eingefügte Restriktionsschnittstelle für XbaI im 3'-Primer hervorgehoben.

Tabelle 4.1: Primer für die Subklonierung von Mrg-Rezeptoren in den pcDNA4-HisMax-Vektor

Rezeptor	hMrgX1	mMrgC	rMrgC
5'-Primer	ATCGATCCAACGGT CTCAACC	ATCGATCCAACCAT CTCATCC	ATCGATCCAACCAT CTCATCC
3'-Primer	CGTCTAGATCACTG CTCCAATCTGC	CGTCTAGATCAATA TCTGCTTTCTG	CGTCTAGATCAACA TCTCCTTTCTG
Stamm- vektor	pcDNA3.1-hMrgX1	pZL1-mMrgC	pBluescript-rMrgC

4.1.8.2 Expressionskonstrukte des TRPV1-Ionenkanals

Der Expressionsvektor des TRPV1-Ionenkanals der Ratte (Hellwig, 2005), in dem das unveränderte TRPV1-Protein an seinem C-Terminus mit dem *yellow fluorescent protein* (YFP) fusioniert wurde (pcDNA3.1-TRPV1-YFP), ist freundlicherweise von Prof. Timothy D. Plant (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Philipps-Universität Marburg) zur Verfügung gestellt worden. Im TRPV1-Protein existieren zwei Serine an Position 502 und 800, die an der PKC-vermittelten Regulation der TRPV1-Aktivität beteiligt sind (Bhave, 2003). TRPV1-Mutanten, bei denen jeweils ein Serin durch Alanin ausgetauscht worden ist, TRPV1-S502A-YFP und TRPV1-S800A-YFP, wurden ebenfalls von Prof. Plant zur Verfügung gestellt (Numazaki, 2002, Kleibeuker, 2007).

Im Rahmen dieser Arbeit wurden weitere Mutanten des TRPV1-Proteins hergestellt. Im Jahr 2008 beschrieben Woo und Kollegen die Möglichkeit der direkten Bindung von DAG an das TRPV1-Protein und konnten zeigen, dass das Vorhandensein von Tyrosin 511 für die DAG-Bindung unverzichtbar ist (Woo, 2008). Zur Generierung einer TRPV1-Mutante, bei der Tyrosin 511 durch ein Alanin ersetzt ist, wurde das *QuickChange™ Site-directed* Mutagenesekit der Firma Agilent eingesetzt. Diese Technik nutzt die Fähigkeit von langen Oligonukleotiden, trotz weniger Fehler bei der Basenpaarung eine stabile Hybridisierung zu ergeben, sowie die Abhängigkeit des Restriktionsenzym DpnI von einer DNA-Methylierung in seiner Erkennungssequenz, so dass nur bakteriell replizierte DNA, nicht aber *in vitro* durch eine DNA-Polymerase

generierte DNA, verdaut wird. Mit Hilfe des Internet-basierenden *primer design programs* der Firma Stratagene (www.stratagene.com/qcprimerdesign) wurden zunächst ein *sense*- und ein *antisense*-Primer entworfen, die auf beiden Seiten des DNA-Tripletts, das für Tyrosin 511 kodiert, 25 korrekte Basenpaarungen durchführen können. Im Bereich des zu mutierenden DNA-Tripletts wurde die Basenfolge 5'-TAC-3' auf dem kodogenen Strang gegen die Basenfolge 5'-GCT-3' ausgetauscht, so dass bei der Translation anstatt eines Tyrosins ein Alanin in das naszierende Protein eingebaut wird. Mit diesen beiden Primern und dem pcDNA3.1-TRPV1-YFP-Vektor als Matrize wurden nachfolgend solche mutierten Plasmide synthetisiert, die sich durch je einen Einzelstrangbruch pro Strang jeweils 25 Basen vom mutierten Triplet entfernt auszeichnen. Um bei der Synthese dieser neuen mutierten Plasmide keine zusätzlichen Mutationen zu verursachen, wurde die DNA-Polymerase *PfuTurbo* eingesetzt, die sich durch eine sehr geringe Fehlerrate aufgrund ihrer Korrekturleseaktivität auszeichnet. Es wurde folgende Lösung pipettiert und nachfolgend in einem Thermozykler mit den angegebenen Bedingungen inkubiert:

<u>Pipettierschema</u>	<u>Thermozyklerbedingungen</u>	
5 µl 10x Reaktionspuffer	95 °C	30 Sekunden
10 ng DNA-Matrize	95 °C	30 Sekunden
125 ng <i>sense</i> -Primer	55 °C	1 Minute
125 ng <i>antisense</i> -Primer	68 °C	9 Minuten
1 µl dNTP-Mix		
2,5 U <i>PfuTurbo</i>		
ad 50µl ddH ₂ O		

X 12

Danach wurde die Matrize selektiv degradiert, indem nach Zugabe von zehn Einheiten des Restriktionsenzym DpnI für eine Stunde bei 37 °C verdaut wurde. Schließlich wurden die mutierten Plasmide in kompetente Bakterien (*XL1 blue supercompetent cells*) transformiert (vgl. Abschnitt 4.2.2.2), auf mit Ampicillin versetzte LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Die erfolgreiche Mutation wurde in den resultierenden Klonen durch Restriktionsanalyse nachgewiesen.

Da PIP₂-neutralisierende Antikörper den TRPV1 aktivieren (Chuang, 2001), wurde auf eine inhibitorische Wirkung von PIP₂ auf die TRPV1-Aktivität geschlossen, die durch Bindung an das C-terminale Ende des TRPV1-Proteins vermittelt werden soll (Prescott, 2003). Diesem Befund folgend wurde hier eine C-terminale Deletionsmutante des TRPV1-Proteins generiert, bei der die letzten 43 Aminosäuren, beginnend mit Aminosäure 777, fehlen (TRPV1- δ 777-820-YFP). Dafür wurde ein Primer hergestellt, der an die Kodone für Aminosäure 776 bis 771 bindet und in Richtung des Translationsstarts des TRPV1-Proteins verlängert werden kann, und ein weiterer, der an

den Beginn des YFP-Gens hybridisiert, um dann in Richtung des Translationsendes des YFP-Gens verlängert zu werden. Unter Verwendung der *PfuTurbo* DNA-Polymerase konnten mit dem pcDNA3.1-TRPV1-YFP-Vektor als Matrize mutierte Plasmide hergestellt werden, die zwischen dem Kodon 776 des TRPV1-Gens und dem ersten Kodon des YFP-Gens einen Doppelstrangbruch aufweisen. Ebenso wie bei der Herstellung des TRPV1-Y511A-YFP-Mutante wurde die Matrize, die aus Bakterien aufgereinigt worden ist, mit dem methylierungssensitiven Restriktionsenzym DpnI selektiv verdaut. Nach Aufreinigung der neuen mutierten Plasmide musste der Doppelstrangbruch noch durch eine DNA-Ligase repariert werden (vgl. Abschnitt 4.2.2.7). Die T4 DNA-Ligase benötigt dafür einen 5'-Phosphatrest in der zu ligierenden DNA. Um dem gerecht zu werden, wurden die eingesetzten Primer vor der PCR an ihrem 5'-Ende mit einem Phosphatrest versehen. Nach der erfolgreichen Ligation wurde das Produkt ebenfalls in kompetente Bakterien (*XL1 blue supercompetent cells*) transformiert, auf mit Ampicillin versetzte LB-Agarplatten ausgestrichen und über Nacht inkubiert. Die erfolgreiche Mutation wurde in den resultierenden Klonen durch Restriktionsanalyse nachgewiesen.

Schließlich wurde im Rahmen dieser Arbeit eine TRPV1-Doppelmutante hergestellt, bei der neben dem Fehlen des putativen PIP₂-Sensors auch die DAG-Bindestelle Y511 zu Alanin mutiert ist. Dafür wurde analog zur Generierung der TRPV1-Y511A-YFP-Mutante verfahren, einzig die Deletionsmutante TRPV1- δ 777-820-YFP wurde als Matrize eingesetzt. Einen Überblick über alle TRPV1-Mutanten, die in dieser Arbeit eingesetzt worden sind, findet sich in Tabelle 4.2.

Tabelle 4.2: Übersicht über TRPV1-Expressionskonstrukte

Name	Mutation	Generierung
pcDNA3.1-TRPV1-YFP	keine	(Hellwig, 2005)
TRPV1-S800A-YFP	Serin 800 → Alanin	(Numazaki, 2002)
TRPV1-S502A-YFP	Serin 502 → Alanin	(Numazaki, 2002)
TRPV1-Y511A-YFP	Tyrosin 511 → Alanin	(Solinski, 2012)
TRPV1- δ 777-820-YFP	Deletion 777 - 820	(Solinski, 2012)
TRPV1-Y511A- δ 777-820-YFP	Tyrosin 511 → Alanin + Deletion 777 - 820	(Solinski, 2012)

4.1.8.3 Reportergenkonstrukte

In dieser Arbeit wurden verschiedene Reportergenkonstrukte eingesetzt, um Transkriptionsfaktor-spezifische Signaltransduktionskaskaden des hMrgX1-Rezeptors aufzuklären. Abbildung 4.2 gibt einen schematischen Überblick über den Aufbau eines solchen Reportergenkonstruktes. Dabei ist besonders darauf hinzuweisen, dass alle hier

verwendeten Reportergenkonstrukte die Luziferase des Glühwürmchens (*Firefly*) als Reportergen tragen, das jeweils unter der transkriptionellen Kontrolle verschiedener Transkriptionsfaktoren steht, die ihr jeweiliges *Response Element* aktivieren.

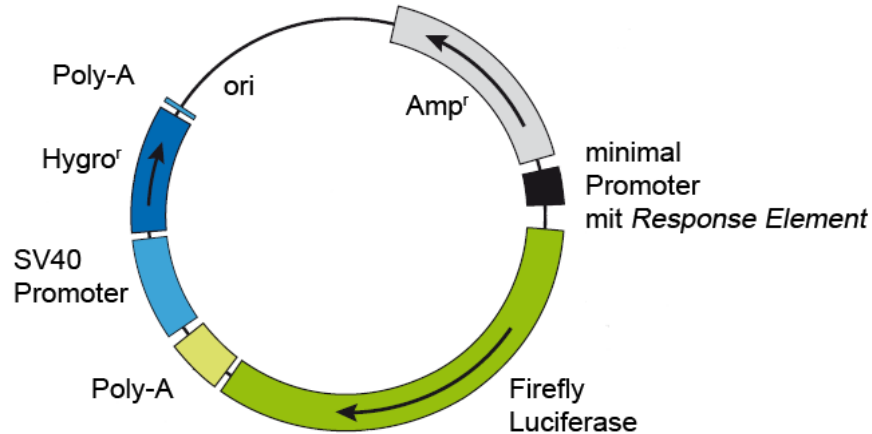


Abbildung 4.2: Schematischer Aufbau eines Reportergenvektors

Die Identität der hier verwendeten Reportergenkonstrukte sowie deren Herkunft werden in Tabelle 4.3 zusammenfassend dargestellt. Zur Bereitstellung der jeweiligen Vektoren waren Dr. Susanne Mühlich, Dr. Thomas Büch und Dr. Andreas Breit (alle Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) freundlicherweise bereit.

Tabelle 4.3: Überblick über Reportergenkonstrukte und aktivierende Transkriptionsfaktoren

Name	Transkriptionsfaktor	Generierung
6xCRE-Luz	CREB	(Himmeler, 1993)
Fos-Luz	STAT-3, TCF/SRF, AP-1	(Cen, 2003)
5xSRE-Luz	TCF/SRF	(Muehlich, 2008)
4xNFAT-Re-Luz	NFAT	Promega Corporation: pGL4.30

4.1.8.4 Weitere Vektoren

Expressionskonstrukte für die beiden ubiquitär exprimierten β -Arrestine, β -Arrestin-1 und -2, die an ihrem C-Terminus mit *green fluorescent protein* (GFP, β -Arrestin-1) bzw. YFP (β -Arrestin-2) fusioniert worden sind (Hoffmann, 2008), wurden freundlicherweise von Dr. Carsten Hoffmann (Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Julius-Maximilians-Universität Würzburg) zur Verfügung gestellt. Der, auf Aequorin basierende, Ca^{2+} -Sensor pG5A (Baubet, 2000) wurde freundlicherweise von Dr. Vladimir Chubanov (Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

4.2 Methoden

4.2.1 Zellkultur

4.2.1.1 Kultivierung

Zelllinien zeichnen sich durch ihre praktisch unbegrenzte Teilungsfähigkeit aus, die sich aus ihrer tumorigenen Transformation ergibt. Bis auf LAD2-Zellen wurden alle hier eingesetzten Zelllinien (vgl. Abschnitt 4.1.6) in 175 cm²-Zellkulturflaschen als adhärente Monolayer bis zu einer Konfluenz von 80 bis 90 % in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C kultiviert. Ab diesem Stadium der Konfluenz setzt das Phänomen der Kontaktinhibition ein, welches in einer Blockade der Proliferation resultiert. Um die Zellen dauerhaft im proliferativen Zustand zu halten, wurde daher in geeigneten Zell-spezifischen Abständen das Medium von den Zellen abgesaugt und es wurde mit 6 ml Ca²⁺- und Mg²⁺-freiem *phosphate-buffered saline* (PBS) gewaschen. Der Entzug der divalenten Kationen soll dabei die nachfolgende Ablösung der Zellen vom Flaschenboden erleichtern, da die Zell-Matrix-Adhäsion über Integrine stark von Ca²⁺- und Mg²⁺-Ionen abhängig ist (Takeichi, 1990). Das eigentliche Ablösen der Zellen wird nach dem Absaugen des PBS durch Inkubation mit 3,5 ml einer 0.05 %-igen Trypsin-Lösung bewerkstelligt. Dieser Prozess wurde durch Inkubation für 1 bis 2 Minuten bei 37 °C beschleunigt und durch den Zusatz von 0,5 mM EDTA erleichtert. Die abgelösten Zellen wurden mit 11 ml Kulturmedium, in dem Trypsininhibitoren die proteolytische Aktivität des Trypsins sofort beenden, aufgenommen, in eine Zentrifugenröhre überführt und für 3 Minuten bei 800 x g sedimentiert. Nach Absaugen des Überstandes wurden die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert und ein geeigneter Teil in die 175 cm²-Zellkulturflasche zur weiteren Kultivierung zurückgegeben. Die restlichen Zellen konnten in einer geeigneten Zellzahl für geplante Versuche auf Loch-Platten oder Petrischalen ausgesät werden und standen nach einem Tag für den Versuch zur Verfügung.

Primäre Spinalganglienneurone haben, im Gegensatz zu Zelllinien, keine proliferative Aktivität. Sie wurden bei Bedarf aufgetaut (vgl. 4.2.1.3) und in einer Dichte von mehr als 10,000 Zellen pro cm² auf 6-Loch-Platten ausgesät. Damit ergab sich aus der Zellzahl pro Mikroschraubröhre von 5 x 10⁵ Zellen eine Fläche von zwei kompletten 6-Loch-Platten. Die Zellen wurden erst nach 5 Tagen in Kultur für ein Experiment verwendet. In dieser Zeit wurde an jedem zweiten Tag die Hälfte des Kulturmediums (1 ml) gegen frisches Kulturmedium ausgetauscht.

LAD2-Zellen wurden als Suspensionskultur in feuchter Atmosphäre mit 5 % CO₂ bei 37 °C gehalten, so dass die Zellen ohne vorherigen Verdau mit Trypsin direkt aus einer Zellkulturflasche entnommen werden konnten.

4.2.1.2 Kryokonservierung

Zellen können durch anhaltende Lagerung in flüssigem Stickstoff für praktisch unbegrenzte Zeit verwahrt werden. Dafür werden Zellen aus einer Zellkulturflasche gewonnen und sedimentiert (vgl. Abschnitt 4.2.1.1). Die Zellen werden nachfolgend in eiskaltem FCS, das mit 10 % Dimethyl-sulfoxid (DMSO) versetzt worden ist, resuspendiert und in Mikroschraubröhren verteilt. Das DMSO soll dabei im nachfolgenden Einfrierprozess die Bildung von Eiskristallen und die daraus resultierende Zerstörung der Zellen verhindern. Die Mikroschraubröhren werden nun in einem mit Isopropanol gefüllten Einfrierkarussell positioniert, in welchem nach der Platzierung in einem -80 °C Tiefkühlschrank ein langsamer, gleichförmiger Einfrierprozess initiiert wird. Nach 2 bis 3 Tagen werden die eingefrorenen Zellen dann in flüssigen Stickstoff zur Dauerlagerung überführt.

4.2.1.3 Auftauen von kryokonservierten Zellen

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wird eine Mikroschraubröhre mit den gewünschten Zellen aus dem Stickstofftank entnommen und durch kurze Inkubation bei 37 °C angetaut. Die Zellen werden sodann in 25 ml Kulturmedium überführt und auf eine 175 cm²-Zellkulturflasche ausgesät. Nach 24 Stunden wird das Medium komplett ausgetauscht, um den erhöhten DMSO-Gehalt im Medium zu entfernen.

4.2.1.4 Beschichtung von Loch-Platten zur Verbesserung der Zelladhärenz

Im Rahmen dieser Arbeit wurden sterile Gefäße für die Zellkultur verwendet, die für die Kultivierung adhärenter Zellen geeignet sind. Allerdings wird von Seiten des Herstellers darauf hingewiesen, dass die Wachstumsoberfläche mit Sauerstoffgruppen gesättigt ist und daher mehrheitlich negativ geladen vorliegt. Da die Glykokalyx einer Zelle auch mehrheitlich negativ geladen ist, ergibt sich so eine elektrostatische Abstoßung, die der Adhärenz von Zellen entgegenwirkt.

Für verschiedene Experimente ist eine besonders zuverlässige Adhärenz von Zellen an die Wachstumsoberfläche notwendig. Um das zu gewährleisten, wurden Loch-Platten mit einer 100 µg/ml-konzentrierten Lösung des kationischen Polymers Poly-L-Lysin (30,000 bis 70,000 kDa) beschichtet und für 30 Minuten bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. In dieser Zeit bildet sich ein positiv geladener Film des Polymers über der Wachstumsoberfläche, an den Zellen durch elektrostatische Anziehung sehr effizient adhären können. Die Poly-L-Lysin-Lösung wurde danach

abgenommen und die frisch abgelösten Zellen konnten auf die noch feuchte Loch-Platte ausgesät werden.

Primäre Spinalganglienneurone wurden im Rahmen dieser Arbeit auf 6-Loch-Platten kultiviert, deren Oberflächenbeschaffenheit durch die Beschichtung mit Poly-L-Ornithin (30,000 bis 70,000 kDa) speziell für diese Zellen verbessert wurde. Dafür wurde eine 0.01 %-ige Poly-L-Ornithin-Lösung für 60 Minuten bei RT auf der Loch-Platte inkubiert, abgesaugt und mit sterilem ddH₂O wurden überschüssige Reste der Poly-L-Ornithin-Lösung abgewaschen. Sodann wurde die Platte getrocknet und erst danach mit frisch aufgetauten Zellen beschickt.

4.2.1.5 Transfektion von eukaryotischen Zellen

Zur heterologen Expression eines Gens in Säugetierzellen muss dieses zunächst in die entsprechende Zelle verbracht werden. Dieser Vorgang wird als Transfektion bezeichnet. Im Rahmen dieser Arbeit wurden dafür das kationische Polymer PromoFektin der Firma PromoCell, Heidelberg, oder in einigen Reportergeranalysen das Neon[®]-Elektroporationsgerät der Firma Invitrogen genutzt.

4.2.1.5.1 Transfektion mit PromoFektin

PromoFektin bildet mit der zu transfizierenden DNA stabile Komplexe aus. Diese Komplexe sind aufgrund der hohen positiven Ladungsdichte des PromoFektins positiv geladen, können so an die Zelloberfläche adhären und werden schließlich endozytotisch aufgenommen. Im endosomalen Kompartiment erfüllt das PromoFektin weitere Aufgaben, die eine effektive Transfektion begünstigen. Hier bindet es Protonen, so dass zum einen die spontane saure Hydrolyse der DNA verhindert wird und zum anderen die Nuklease-vermittelte DNA-Hydrolyse aufgrund eines suboptimalen, zu hohen pH-Wertes nicht stattfinden kann. Die andauernde Translokation von Protonen in das Endosom führt schließlich zu einem erhöhten osmotischen Druck, der das Endosom rupturieren lässt. So wird die „nackte“ DNA ins Zytoplasma freigesetzt und kann über bislang ungeklärte Transportprozesse in den Nukleus verbracht werden. Hier wird sie für 2 bis 3 Tage transkribiert, so dass im Rahmen dieser Arbeit alle Versuche 24 bis 72 Stunden nach der Transfektion durchgeführt wurden.

Für die Transfektion von Zellen in 6-Loch-Platten werden 2 µg Plasmid-DNA und 4 bis 6 µl PromoFektin separat voneinander in jeweils 100 µl Serum-freien Medium verdünnt, vereinigt und für 30 Minuten inkubiert. Diese Lösung wird schließlich vorsichtig auf die Zellen getropft. Entsprechend der kleineren Wachstumsoberfläche anderer Loch-Platten wurden entsprechende Transfektionsansätze ab- bzw. bei Petrischalen heraufskaliert.

4.2.1.5.2 Transfektion durch Elektroporation

Bei der Elektroporation werden Zellen kurzzeitig einem elektrischen Feld ausgesetzt, wodurch die Zellmembran transient destabilisiert wird und kleine Poren entstehen, durch die Plasmid-DNA direkt in das Zytoplasma gelangen kann. Der nachfolgende nukleäre Import ist bislang ungeklärt. Mit dieser Technik lässt sich, im Vergleich zur Lipofektionstechnik, eine deutlich höhere Transfektionseffizienz erzielen. Der Prozess der Elektroporation kann sich aber auch negativ auf die zelluläre Vitalität auswirken. Daher müssen die jeweiligen Bedingungen für eine Zelllinie optimal angepasst werden. So kann die Stromstärke und deren Dauer (Anzahl der Pulse und Dauer eines Pulses) bei der Elektroporation mit dem Neon[®]-Elektroporationsgerät variiert werden. Die Firma Invitrogen gibt dazu in ihrer Datenbank unter Angabe von Transfektionseffizienz und beobachteter Zellvitalität erfolgreich angewandte Bedingungen bekannt. Außerdem wurde eine geeigneten Geometrie des elektrischen Feldes entwickelt, indem Zellen in eine Pipette aufgezogen werden, deren Kern, eine Goldelektrode, damit in große Nähe zu den Zellen gebracht wird. Schließlich wurde die Zytotoxizität von Antibiotika im Kulturmedium nach der Elektroportion erkannt, so dass mit dem Neon[®]-Elektroporationsgerät eine kaum höhere Sterblichkeit der Zellen, aber eine deutlich höhere Transfektionseffizienz erreicht wird.

Es werden F11-hMrgX1-Zellen aus einer Flasche abgelöst (vgl. Abschnitt 4.2.1.1). Für die Elektroporation werden je 1×10^5 Zellen in Resuspendierungspuffer (Invitrogen) mit 5 µg Plasmid-DNA gemischt und sodann durch Applikation von 2 Pulsen mit einer Spannung von 900 V und einer Dauer von 35 ms elektroporiert. Nach der Elektroporation werden die Zellen vereinigt, um eine homogen transfizierte Population zu erhalten, und in Kulturmedium ohne Antibiotikazusatz zu 1×10^5 Zellen pro Loch in 24-Loch-Platten ausgesät.

4.2.1.6 Herstellung stabil-exprimierender Zelllinien

Nach der Transfektion eukaryotischer Zellen kommt es in sehr seltenen Fällen vor, dass das Plasmid Nuklease-vermittelt linearisiert und Teile chromosomal integriert werden. In diesem Fall wird die Zelle, in der dieses Ereignis vorgekommen ist, vollständig integrierte Gene über den kurzen Zeitraum einer transienten Expression hinaus exprimieren. Da die chromosomale Integration von Teilen eines Plasmides selten vorkommt, ist eine Selektion von Zellen mit integrierter Plasmid-DNA notwendig. Dafür enthalten eukaryotische Expressionsvektoren in der Regel Gene unter der Kontrolle von viralen Promotern, die eine Resistenz gegen ein Antibiotikum vermitteln. Damit kann durch eine mehrwöchige Kultivierung unter dem jeweiligen Antibiotikum auf Zellen selektioniert werden, die das vollständige Resistenzgen chromosomal integriert haben. Nicht in jedem Fall bedeutet die Integration des Resistenzgens, dass

zusätzlich auch das eigentlich interessierende Insert-Gen integriert wurde. Damit wird nach der Selektion der Nachweis des Insert-Gens notwendig.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Selektionen nach Transfektion verschiedener pcDNA4-HisMax- und pcDNA3.1-Vektoren durchgeführt. Beide Plasmide unterscheiden sich in den kodierten Resistenzgenen. Der pcDNA4-HisMax-Vektor beinhaltet das *ble*-Gen aus *Streptoalloteichus hindustanus*, welches die Resistenz gegen das Antibiotikum Zeocin (oder Bleomycin) vermittelt (Drocourt, 1990, Gatignol, 1988). Das *ble*-Genprodukt kann durch die stöchiometrische Bindung an Zeocin dessen DNA-interkalierenden und -spaltenden, zytotoxischen Eigenschaften inhibieren. Zeocin wurde in allen hierin durchgeführten Selektionen für zwei Wochen bei einer Konzentration von 400 µg/ml und täglichem Wechsel des Mediums eingesetzt. Nach dieser Selektionszeit wurde Zeocin komplett aus dem Medium entfernt, so dass die Zellen danach in normalem Kulturmedium kultiviert wurden.

Der pcDNA3.1-Vektor enthält das *neo*-Gen aus dem bakteriellen Tn5-Transposon, welches die Resistenz gegen das Antibiotikum G-418 (oder Geniticin) vermittelt (Bar-Nun, 1983, Beck, 1982, Davies, 1980). Das *neo*-Genprodukt stellt eine Aminoglykosid-3'-Phosphotransferase dar, die durch Phosphorylierung des G-418 verhindert, dass die Elongation während der Translation inhibiert werden kann. G-418 wurde hier in einer Konzentration von 250 µg/ml für die Selektion bei täglichem Wechsel des Medium eingesetzt. Um den Verlust von integrierter Plasmid-DNA nach der G-418-Selektion zu verhindern, wurden selektionierte Zellpopulationen weiterhin in Kulturmedium mit 250 µg/ml G-418 gehalten.

Tabelle 4.4: Überblick über stabil-exprimierende Zelllinien

Name	Vektor	Ausgangszelllinie	Selektion
HEK293-hMrgX1	pcDNA4-hMrgX1	HEK293	Zeocin
HEK293-mMrgC	pcDNA4-mMrgC	HEK293	Zeocin
HEK293-rMrgC	pcDNA4-rMrgC	HEK293	Zeocin
HEK293-hMrgX1-Ae	pG5A (Aequorin)	HEK293-hMrgX1	G-418 + Zeocin
HEK293-mMrgC-Ae	pG5A (Aequorin)	HEK293-mMrgC	G-418 + Zeocin
HEK293-rMrgC-Ae	pG5A (Aequorin)	HEK293-rMrgC	G-418 + Zeocin
HEK293-hMrgX1-TRPV1	pcDNA4-hMrgX1 + pcDNA3.1-TRPV1	HEK293	G-418 + Zeocin
F11-hMrgX1	pcDNA4-hMrgX1 + pcDNA3.1	F11	G-418

Tabelle 4.4 gibt einen Überblick über alle stabil-exprimierenden Zelllinien, die in dieser Arbeit generiert und z. T. vorab publiziert (Solinski, 2010) oder verwendet wurden. HEK293-hMrgX1- und HEK293-mMrgC-Zellen wurden im Rahmen einer

vorangegangenen Diplomarbeit generiert (Solinski, 2008). Im Rahmen dieser Diplomarbeit wurden in diesen beiden Zelllinien initiale Experimente zur Desensibilisierung Rezeptor-vermittelter Ca^{2+} -Signale und zur Rezeptorendozytose durchgeführt. HEK293-hMrgX1-TRPV1-Zellen wurden freundlicherweise von Dr. Andreas Breit (Walther-Straub-Institut für Pharmakologie und Toxikologie, Ludwig-Maximilians-Universität München) zur Verfügung gestellt.

4.2.2 Molekularbiologische Methoden

4.2.2.1 Herstellung von kompetenten Bakterien

Um Bakterien zur biologischen Plasmidamplifikation zu nutzen, müssen sie zunächst durch ein geeignetes Protokoll für die Aufnahme von Plasmid-DNA, die Transformation, kompetent gemacht werden. In dieser Arbeit wurde dabei die Methode nach Hanahan (Hanahan, 1983) eingesetzt, um *E. coli*-Bakterien des DH5 α -Stammes künstlich für die Transformation kompetent zu machen. Dafür werden Bakterien über Nacht in 1 ml LB-Medium angeimpft. Am nachfolgenden Tag werden 10 μl dieser Lösung in 100 ml LB/K-Medium verdünnt und bei 37 °C und 255 Umdrehungen pro Minute im Bakterienschüttler bis zu einer OD₆₀₀ von 0,4 bis 0,5 inkubiert. Bei dieser OD (optische Dichte) befinden sich die Bakterien in der logarithmischen Wachstumsphase, ein Zustand bei dem sie optimal für die Transformation kompetent gemacht werden können. Die Bakterien werden nachfolgend durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 \times g und 4 °C sedimentiert, in 20 ml eiskaltem FSP-Puffer aufgenommen und wiederum durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 2000 \times g und 4 °C sedimentiert. Nach Resuspendierung in 4 ml FSP-Puffer werden 150 μl DMSO zugesetzt und es wird für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von weiteren 150 μl DMSO wird nochmals für 10 Minuten auf Eis inkubiert. Damit sind die Bakterien bereit für die Transformation durch Hitzeschock, sie können allerdings auch durch Schockgefrieren in flüssigem Stickstoff und anschließende Lagerung bei -80 °C in ihrem kompetenten Zustand konserviert werden.

<u>LB-Medium</u>	<u>LB/K-Medium</u>	<u>FSP-Puffer</u>
85,5 mM NaCl	LB-Medium	10 mM KAcetat
0,5 % Hefeextrakt (w/v)	110 mM Glukose	45 mM MnCl ₂
1 % Trypton/Pepton (w/v)	20 mM MgSO ₄	10 mM CaCl ₂
		100 mM KCl
		10 % Glycerin (v/v)
		3 mM Co(NH ₃) ₆ Cl ₃
		pH 6,4

4.2.2.2 Bakterientransformation durch Hitzeschock

Kompetente Bakterien können nach Inkubation mit Plasmid-DNA und nachfolgender Applikation eines kurzen Hitzeschocks Plasmide aufnehmen, extra-chromosomal replizieren und bei der Zellteilung an beide Tochterzellen weitergeben. Dafür werden entweder frisch generierte kompetente Bakterien verwendet, oder in flüssigem Stickstoff schockgefrorene kompetente Bakterien auf Eis aufgetaut. Durch Mischung der Bakteriensuspension mit Plasmid-DNA bilden sich nach 30 Minuten Inkubation auf Eis Komplexe aus Bakterien und Plasmid-DNA. Werden die Bakterien nun für 90 Sekunden einem Hitzeschock ausgesetzt, indem sie in einem 42 °C warmen Wasserbad inkubiert werden, öffnet sich der bakterielle Zellwandkomplex transient und die Plasmid-DNA kann aufgenommen werden. Nachfolgend werden die Bakterien für mindestens 2 Minuten auf Eis inkubiert, so dass sich die Poren der Zellwand wieder schließen. Zur Trennung von transformierten und nicht transformierten Bakterien wird die Suspension auf LB-Agarplatten ausgestrichen, die vorher mit einem geeigneten Antibiotikum inkubiert worden sind. Im Rahmen dieser Arbeit wurden Ampicillin mit einer Endkonzentration von 50 µg/ml oder Kanamycin mit einer Endkonzentration von 100 µg/ml eingesetzt. Die Agarplatten werden dann für 16 bis 20 Stunden bei 37 °C inkubiert. Einzelne Klone werden in 5 ml antibiotikumhaltiges LB-Medium überimpft und über Nacht im Bakterienschüttler inkubiert. Zur quantitativen Plasmidisolation werden 200 µl dieser Suspension auf 200 ml LB-Medium mit Antibiotikum gegeben und es wird nach 18 Stunden Inkubation im Bakterienschüttler mit der Plasmidisolation (vgl. Abschnitt 4.2.2.3) fortgesetzt. Resultierten die isolierten Klone aus der Subklonierung eines Inserts oder aus einer Mutagenese, wurde mit 1 bis 2 ml der Bakteriensuspension eine präparative Plasmidisolation (vgl. Abschnitt 4.2.2.9) durchgeführt, um nachfolgend die Sequenz des Plasmides durch einen geeigneten Restriktionsverdau oder durch Sequenzierung zu analysieren.

LB-Agarplatten

LB-Medium

1,5 % Agar-Agar (w/v)

4.2.2.3 Quantitative Plasmidisolation

Zur quantitativen Isolation von Plasmid-DNA aus Bakterien wurde im Rahmen dieser Arbeit das *Nucleobond xtra midi plus plasmid DNA purification kit* der Firma Macherey-Nagel verwendet. Prinzipiell wird so eine Anionenaustauschchromatographie durchgeführt. Nach der alkalischen Lyse der Bakterien werden in einem Vorfilter die löslichen Plasmide vom Zelldebris, in dem sich auch das sehr viel größere Bakterienchromosom befindet, getrennt. Nach einem Waschschrift wird die DNA durch eine Veränderung des pH-Wertes von der Säule eluiert. Durch eine Fällung mit

Isopropanol kann die DNA entsalzt und in einem geeigneten Volumen ddH₂O aufgenommen werden.

Die quantitative Plasmidisolierung wurde nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Dabei wurden die Anionenaustauschssäule und alle notwendigen Puffer vom Hersteller geliefert.

4.2.2.4 DNA-Konzentrationsbestimmung

Die delokalisierten π -Elektronensysteme der DNA-Basen sind in der Lage, ultraviolettes Licht (260 nm) zu absorbieren. Mit Hilfe des Lambert-Beer'schen Gesetzes kann aus der Extinktion einer Lösung auf deren DNA-Konzentration zurückgerechnet werden. Außerdem bietet die parallele Ermittlung der OD₂₈₀ die Möglichkeit auf Verunreinigungen der Probe mit RNA bzw. Protein zu schließen.

In dieser Arbeit wurde die Konzentration von DNA-Lösungen mit der *Tray Cell* Erweiterung des *BioPhotometer plus* der Firma Eppendorf ermittelt. So kann, ohne eine häufig fehlerbehaftete Vorverdünnung, die vorliegende DNA-Konzentration direkt bestimmt werden.

4.2.2.5 Restriktionsverdau

Restriktionsendonukleasen sind bakterielle Enzyme, die doppelsträngige DNA in definierten Konsensussequenzen spalten. Dabei werden mechanistisch sog. *blunt end cutter* und *sticky end cutter* unterschieden. Der Verdau von DNA mit einem *blunt end cutter* resultiert in dem Fehlen von einzelsträngigen Überhängen, während *sticky end cutter* gerade solche Überhänge produzieren. Diese Einteilung spielt bei der Subklonierung eine wichtige Rolle, da darauf geachtet werden muss, dass nach dem Restriktionsverdau eines Inserts und einem weiteren Restriktionsverdau des Zielvektors kompatible Enden für eine Hybridisierung entstehen. Der Einsatz von zwei Restriktionsenzymen mit unterschiedlichen Konsensussequenzen resultiert in einer gerichteten Hybridisierung, bei der gewährleistet werden soll, dass ein Insert mit dem 5'-Ende seines kodogenen Stranges zum Promoter des Zielplasmides und mit seinem 3'-Ende zum Translationsstopp des Zielplasmides orientiert ist.

Im Rahmen dieser Arbeit wurden alle Restriktionsenzyme von der Firma Fermentas (vgl. Abschnitt 4.1.5) bezogen und in den dafür vorgesehenen Puffern nach Angaben des Herstellers eingesetzt. In einigen Fällen wurden dabei zwei Restriktionsenzyme gleichzeitig benutzt. Falls beide Enzyme in unterschiedlichen Puffern ihre maximale Aktivität aufwiesen, wurde das Internet-basierende Programm *DoubleDigest* (<http://www.fermentas.com/en/tools/doubledigest>) zur Auswahl des optimalen Puffers für beide Enzyme verwendet. In Tabelle 4.5 findet sich eine Übersicht über die hier eingesetzten Restriktionsenzyme und deren Verwendung.

Tabelle 4.5: Übersicht über verwendete Restriktionsenzyme

Name (Isoschizomer)	Verwendung
EcoRV (Eco32I)	Mrg-Rezeptor-Subklonierung, 5'-Ende vor der Ligation
XbaI	Mrg-Rezeptor-Subklonierung, 3'-Ende vor der Ligation
AfeI (Eco47III) + MluI	Kontrolle der Y511A-Mutagenesen des TRPV1
StuI (Eco147I)	Kontrolle der hMrgX1- und rMrgC-Subklonierung
NdeI	Kontrolle der mMrgC-Subklonierung
XhoI	Kontrolle der TRPV1- δ 777-820-Mutagenese

4.2.2.6 PCR

Die PCR ist eine Technik, mit deren Hilfe *in vitro* DNA-Abschnitte einer Matrize amplifiziert werden können. Dafür werden temperaturstabile DNA-Polymerasen, das erste dieser Enzyme wurde aus dem Bakterium *Thermus aquaticus* isoliert und daher *Taq*-Polymerase benannt, spezifische DNA-Oligonukleotide, sog. Primer, und die Temperaturabhängigkeit der Hybridisierung zweier DNA-Einzelstränge genutzt. So werden die jeweilige DNA-Matrize, zwei Primer, die auf unterschiedlichen Strängen der Matrize per komplementärer Basenpaarung hybridisieren und jeweils mit ihrem 3'-Ende zueinander zeigen, Desoxyribonukleotide sowie die temperaturstabile Polymerase in einem geeigneten Puffer gemischt. Dann wird das Reaktionsgefäß in ein PCR-Gerät gestellt, in dem je nach Applikation 30 bis 50 gleichförmige Temperaturzyklen wiederholt werden. Jeder Zyklus beginnt mit der sog. Denaturierungsphase, in der durch eine Temperatur von 95 °C jegliche DNA-Doppelstränge in Einzelstränge getrennt werden. Danach folgt eine Anlagerungsphase, in der die beiden Primer entsprechend ihrer Sequenz an die DNA-Matrize hybridisieren. Die dabei gewählte Temperatur hängt in erster Linie von der genauen Sequenz der Primer ab, beispielsweise von ihrem Gehalt an Guanin- und Cytosinnukleotiden, die mit einer Wasserstoffbrücke mehr hybridisieren, als Adenin- und Thyminnukleotide. Durch einen hohen Überschuss der Primer im Vergleich zur Matrize wird in dieser Phase verhindert, dass präferentiell Matrizendoppelstränge rehybridisieren. Jeder Zyklus wird mit einer Elongationsphase beendet, in welcher die Polymerase die Primer von ihrem 3'-Ende entsprechend der jeweiligen Matrize verlängert. Die Temperatur in diesem Teil des Zyklus entspricht dabei dem Temperaturoptimum der eingesetzten Polymerase (72 °C). Theoretisch wird so mit jedem Zyklus die Menge an DNA-Fragmenten zwischen beiden Primern verdoppelt.

In dieser Arbeit wurde die PCR eingesetzt, um Inserts für Subklonierungen zu generieren (vgl. Abschnitt 4.1.8.1). Dies erfordert eine DNA-Polymerase mit Korrekturleseaktivität und hoher Prozessivität. Beides wird von der DNA-Polymerase aus *Pyrococcus furiosus*, als *Pfu*-Polymerase benannt, besonders gut erfüllt. Außerdem

wird durch die *Pfu*-Polymerase am 3'-Ende eines DNA-Fragmentes kein Adenin-nukleotidüberhang angefügt, so dass *blunt end*-Subklonierungen durchgeführt werden können (vgl. Abschnitt 4.1.8.1). Die Zusammensetzung einer typischen PCR-Reaktion sowie das genutzte Protokoll des PCR-Gerätes sind unten dargestellt. Die genauen Matrizen und Sequenzen der eingesetzten Primer finden sich in Tabelle 4.1.

<u>Pipettierschema</u>	<u>Temperaturprotokoll</u>		
10 µl 10x Reaktionspuffer	95 °C	3 Minuten	
10-50 ng DNA-Matrize	95 °C	30 Sekunden	
660 ng Vorwärts-Primer (20mer)	60 - 65 °C	30 Sekunden	X 35
660 ng Rückwärts-Primer (20mer)	72 °C	2 Minuten	
2 µl 10mM dNTP-Mix	72 °C	5 Minuten	
1,25 U <i>Pfu</i> DNA-Polymerase			
ad 50 µl ddH ₂ O			

4.2.2.7 Ligation

Die Ligation von zwei DNA-Fragmenten bezeichnet ihre kovalente Verknüpfung unter Katalyse einer DNA-Ligase und ATP-Verbrauch. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die DNA-Ligation während der Subklonierung der Mrg-Rezeptoren in den pcDNA4-HisMax-Vektor sowie bei der Generierung der TRPV1-δ777-820-Mutante eingesetzt. Im ersten Fall wurde eine gerichtete Subklonierung durch den Einsatz von zwei unterschiedlichen Restriktionsenzymen bewerkstelligt, so dass die Ligase vom Vektor aus gesehen auf der Promoterseite zwei DNA-Enden ohne Einzelstrangüberhang und auf der Translationsstoppseite zwei DNA-Enden, deren kompatible Enden über vier Basen hybridisiert sind, verknüpft. Im zweiten Fall ist aus der Mutagenese-PCR nur ein linearisiertes DNA-Fragment entstanden, dass durch die Ligase zirkularisiert wird.

In dieser Arbeit wurde die T4 DNA-Ligase der Firma Fermentas (vgl. Abschnitt 4.1.5) mit dem mitgelieferten Puffer eingesetzt. Dafür werden zunächst die verschiedenen DNA-Moleküle mit ddH₂O auf 17,75 µl gebracht und für 3 Minuten auf 65 °C erhitzt, um mögliche Sekundärstrukturen der DNA oder Konkatemere aufzubrechen. Die Lösung wird sodann auf Eis abgekühlt und es werden 2 µl 10-fach konzentrierter Ligasepuffer sowie 1 U T4 DNA-Ligase (entspricht 0,25 µl) zugegeben. Im Falle der Mrg-Rezeptor Subklonierungen wurde diese Lösung über Nacht bei RT inkubiert und 10 µl wurden für die Transformation von 100 µl kompetenten Bakterien eingesetzt. Im Falle der TRPV1-Mutagenesen wurde nur für 1 Stunde bei RT ligiert und von dieser Lösung wurde 1 µl für die Transformation von 50 µl kompetenten Bakterien eingesetzt.

4.2.2.8 Agarosegelelektrophorese

Während einer Elektrophorese werden geladene Moleküle im elektrischen Feld aufgetrennt. DNA wird sich dabei auf Grund ihrer negativ geladenen Phosphatreste in Richtung des Pluspols bewegen. Da jedes Nukleotid mit einer negativen Ladung in DNA-Molekülen mit konstanter Ladungsdichte resultiert, erfolgt die Auftrennung unterschiedlich langer DNA-Moleküle in einem Gel definierter Porengröße nur nach ihrer Größe (Anzahl der Nukleotide). Um die DNA-Moleküle im Agarosegel sichtbar zu machen, kann der interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Ethidiumbromid eingesetzt werden. Ethidiumbromid reagiert nach Anregung im ultravioletten Bereich nur, nachdem es in doppelsträngige DNA interkaliert hat, mit einer Fluoreszenz bei 590 nm.

DNA-Lösungen müssen für die Gelelektrophorese vorbereitet werden, indem sie mit einem Glycerin-haltigen, mit Bromphenolblau eingefärbten Ladepuffer (Fermentas) gemischt werden. So wird farblich sichtbar, dass die DNA vom Glycerin auf Grund seiner höheren Dichte in die Taschen des Agarosegels „mitgezogen“ wird. Als Vergleich der Größe einer jeweiligen DNA-Bande dient ein parallel mitgeführter Größenstandard (*GeneRuler* der Firma Fermentas, vgl. Abschnitt 4.1.5).

In dieser Arbeit wurden 1 %-ige Agarosegele (w/v) hergestellt, indem 1 g Agarose in 100 ml TAE Puffer in der Mikrowelle bis zur vollständigen Lösung aufgeköcht wird. Die Lösung wird sodann unter fließendem Wasser auf weniger als 65 °C abgekühlt und mit 0,5 µg/ml Ethidiumbromid versetzt. Nach kurzem Durchmischen wird die Lösung in eine Gelkammer der Firma Peqlab gefüllt. Nach dem vollständigen Erkalten wird das Gel mit TAE-Puffer überschichtet, die Proben werden in die Geltaschen geladen und die Kammer wird für 60 bis 90 Minuten bei einer Spannung von 120 mV mit einer Spannungsquelle verbunden. Danach wird das Gel mit Hilfe eines Geldokumentationssystems (Peqlab) die Ethidiumbromid-Fluoreszenz nachgewiesen und gegebenenfalls fotografiert.

Im Laufe von Subklonierungen oder der TRPV1- δ 777-820-Mutagenese wurden PCR-Reaktionen oder Restriktionsverdaue durchgeführt, die eine nachfolgende Trennung der erwünschten DNA vom Rest des Reaktionsgemisches erforderte. Diese Auftrennung kann durch eine Gelelektrophorese geleistet werden, nach der die DNA aus dem Gelstück, in dem sie sich gegen Ende der Elektrophorese befindet, aufgereinigt werden muss. Solche Gelextraktionen wurden im Rahmen dieser Arbeit mit einem auf Silica-Kügelchen basierenden Kit der Firma Fermentas (vgl. Abschnitt 4.1.5) nach Herstellerangaben durchgeführt.

TAE-Puffer

40 mM Tris/HCl

0,35 % Essigsäure (v/v)

2 mM EDTA

pH 8,3

4.2.2.9 Präparative Plasmidisolierung

Bei einer Ligationsreaktion können trotz gerichteter Klonierung verschiedene neue Plasmide entstehen. Ein nicht-symmetrischer Kontrollverdau kann daher erste Hinweise geben, ob die neuen Vektor-Insert-Übergänge die gewünschte Orientierung besitzen. Für solche Untersuchungen werden nur geringe Mengen an Plasmid-DNA benötigt, zudem stören geringe Verunreinigungen mit Zelldebris die Reaktion nicht nachhaltig. Aufgrund dieser Anforderungen wurde im Rahmen dieser Arbeit ein Protokoll zur präparativen Plasmidisolierung aus Bakterien eingesetzt, bei dem aus 1 bis 2 ml Bakteriensuspension 10 bis 15 µg Plasmid-DNA isoliert werden können. Dieses Verfahren wurde ebenso bei der TRPV1-Y511A-Mutagenese eingesetzt, um den Erfolg des Aminosäureaustausches zu kontrollieren.

1 ml einer zuvor angeimpften Bakteriensuspension wird in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt und für 1 Minute mit 17,000 x g zentrifugiert. Die sedimentierten Bakterien werden sodann in 100 µl Puffer RE resuspendiert und durch Zugabe von 200 µl Puffer LYS lysiert. Diese Lyse wird dabei durch fünfmaliges Invertieren verbessert. Durch Zugabe von 150 µl Puffer NEU und weiteres fünfmaliges Invertieren wird der pH-Wert neutralisiert. Anschließend wird der Zelldebris durch Zentrifugation für 3 Minuten mit 17,000 x g sedimentiert. 300 µl Überstand werden in ein frisches Reaktionsgefäß überführt und die Plasmid-DNA wird durch Zugabe von 240 µl Isopropanol gefällt. Nach einer weiteren Zentrifugation für 15 Minuten bei 17,000 x g wird der Überstand abgesaugt, der DNA-Niederschlag mit 70 %-igem Ethanol gewaschen, getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen.

<u>Puffer RE</u>	<u>Puffer NEU</u>	<u>Puffer LYS</u>
25 mM Tris/HCl	3 M NaAcetat	0,2 M NaOH
10 mM EDTA	pH 4,8	1 % SDS (w/v)
50 µg/ml RNase A		
pH 8,0		

4.2.3 Zellbiologische Methoden

4.2.3.1 Bestimmung der Oberflächenexpression von GPCR

Der *enzyme-linked immuno sorbent assay* (ELISA) stellt eine Technik dar, mit der spezifische Epitope in einer Lösung detektiert werden können. Eine Adaption dieser Technik zur Detektion von Epitopen in ganzen Zellen kann genutzt werden, um Epitope spezifisch an der äußeren Oberfläche der Zelle nachzuweisen. Dafür werden Zellen auf dem Boden von Loch-Platten mit hoch-spezifischen primären Antikörpern inkubiert und es wird ausgenutzt, dass die Zellmembran intakter Zellen für größere Makromoleküle

wie Antikörper undurchlässig ist. Der F_c-Teil der primären Antikörper wird danach von Enzym-gekoppelten (hier Meerrettich-Peroxidase, *horseradish peroxidase*, HRP), sekundären Antikörpern erkannt. Mit Hilfe des oxydativen Umsatzes des farblosen HRP-Substrates ortho-Phenylendiamin unter Verbrauch von H₂O₂ in dessen chromogene Form 2,3-Diaminophenazin kann nach photometrischer Vermessung (OD₄₉₅) der Farbintensität der Lösung auf das Vorhandensein der untersuchten Epitope auf der Oberfläche der Zellen zurückgeschlossen werden.

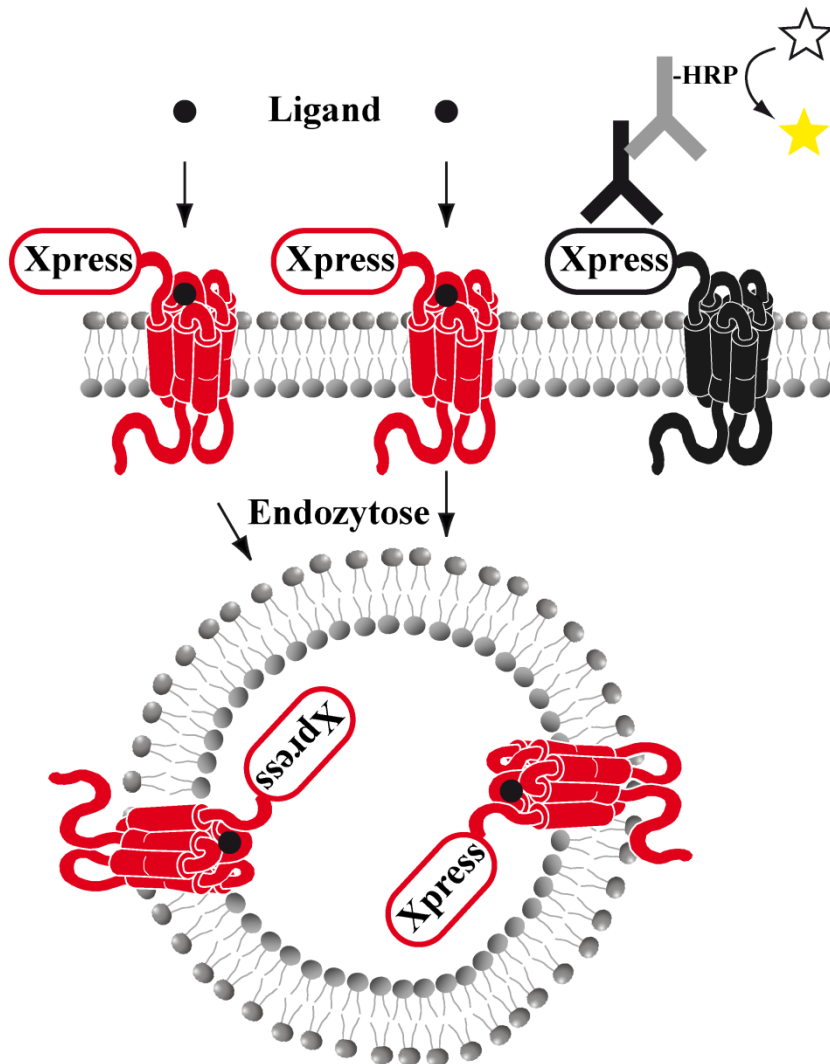


Abbildung 4.3: Prinzip des Nachweises der Liganden-induzierten Endozytose eines GPCR

N-terminale Fusionsproteine eines GPCR mit dem Xpress-Epitop befinden sich in der Zellmembran. Nach Stimulation mit ihrem Liganden werden Ligand-Rezeptor-Komplexe (rot) mittels Endozytose internalisiert und sind, im Gegensatz zu einem nicht endozytierten GPCR (schwarz), für den HRP-abhängigen chromogenen Antikörpernachweis nicht mehr zugänglich.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe der Bestimmung der Oberflächenexpression die Liganden-induzierte Endozytose von GPCR untersucht (Breit, 2006a, Lavoie, 2002). Dafür werden Rezeptor-exprimierende Zellen mit

geeigneten Liganden für 30 Minuten inkubiert und die resultierende Farbintensität wird mit derer von nicht stimulierten Zellen verglichen. Sollte die Stimulation mit dem Liganden zu einer Rezeptorendozytose geführt haben, resultiert dies in einer Verminderung der messbaren Farbintensität, während bei fehlender Endozytose die Farbintensität unverändert bleibt (vgl. Abbildung 4.3).

2×10^5 Zellen werden einen Tag vor der Bestimmung der Oberflächenexpression eines GPCR auf Poly-L-Lysin-beschichtete 12-Loch-Platten ausgesät. Das Kulturmedium wird von den Zellen abgesaugt und durch 360 μ l Serum-freies Medium ersetzt. Nun erfolgt die Stimulation der Zellen für 30 Minuten bei 37 °C, indem 40 μ l einer 10-fach-konzentrierten Lösung des jeweiligen Liganden auf die Zellen pipettiert werden. In jedem Experiment werden auch nicht stimulierte Zellen untersucht, die als Referenzwert fungieren. Alle Experimente werden in Triplikaten oder Quadruplikaten durchgeführt. Nach der Stimulation werden die Zellen sofort auf Eis gestellt, um sie im momentanen Zustand zu arretieren. Es folgt ein Waschschriff mit PBS/*bovine serum albumin* (BSA) für 10 Minuten, bevor Xpress-Epitope an der Zelloberfläche durch die Inkubation mit 1,1 μ g/ml Anti-Xpress-Antikörper (entspricht einer Verdünnung von 1:2,000 in PBS/BSA) für 1 Stunde bei 4 °C auf dem Taumelschüttler detektiert werden. Nun werden die Zellen mit 4 % Paraformaldehyd in 100 mM Na_2PO_4 -Puffer für 10 Minuten auf Eis fixiert. Vor der einstündigen Inkubation mit einem HRP-gekoppelten Anti-Maus-Sekundärantikörper (1:3,000 in PBS/BSA) auf dem Taumelschüttler wird die Fixans für 10 Minuten mit PBS/BSA gewegewaschen. Nachfolgend wird nicht gebundener Sekundärantikörper gut gewegewaschen (2 x 20 Minuten mit 2 ml PBS/BSA und 2 x 1 Minute mit 800 μ l PBS). Das farblose ortho-Phenylendiamin wird nach Herstellerangaben frisch angesetzt und 400 μ l pro Loch werden auf die Zellen gegeben. Es erfolgt eine 5- bis 15-minütige Inkubation im Dunkeln, bevor die Enzymreaktion durch Zugabe von 100 μ l 3 M HCl abgestoppt wird. Von dieser Lösung werden schließlich 200 μ l in eine 96-Loch-Platte überführt, in der sodann die Absorption bei 495 nm vermessen wird.

<u>PBS/BSA</u>	<u>Substratlösung</u>
2,5 mM KCl	103 mM Na_2PO_4
1,5 mM KH_2PO_4	48,6 mM Zitronensäure
140 mM NaCl	0,12 % H_2O_2 (v/v)
8 mM Na_2HPO_4	1 Tablette ortho-Phenylendiamin
0,5 % BSA (w/v)	pH 5,0
pH 8,0	

4.2.3.2 Bestimmung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen

Ca^{2+} -Ionen sind einer der wichtigsten sekundären Botenstoffe der Zelle und an vielen biologischen Prozessen, beispielsweise der Muskelkontraktion oder der vesikulären Exozytose, beteiligt. Damit haben Techniken, die die Veränderungen intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen nahezu in Echtzeit detektieren können, eine hohe Bedeutung im Rahmen der biomedizinischen Forschung. Zwei häufig verwendete Techniken wurden im Rahmen dieser Arbeit angewandt (Baubet, 2000, Grynkiewicz, 1985). Die molekularen Ca^{2+} -Detektoren basierten dabei zum einen auf Lumineszenz (Aequorin) und zum anderen auf Fluoreszenz (Fura2).

4.2.3.2.1 Aequorin als molekularer Ca^{2+} -Detektor

Aequorin ist ein 423 kDa großes Protein aus der Qualle *Aequoria victoria*. Unter Sauerstoffverbrauch bindet ein Luziferin, das Coelenterazin H, als prosthetische Gruppe an das Apoprotein Aequorin (Tsuji, 1986). Nach Bindung von drei Ca^{2+} -Ionen an Aequorin wird die prosthetische Gruppe zum Coelenteramid oxidiert und emittiert blaues Licht einer Wellenlänge von 470 nm, um aus diesem angeregten Zustand in den Grundzustand zurückzukehren (Shimomura, 1974). In der Qualle wird dieses Licht jedoch nur partiell emittiert, da ein Teil strahlungsfrei über Förster-Resonanz-Energietransfer an GFP-Moleküle übertragen wird, welche so in den angeregten Zustand übergehen und bei der Relaxation zusätzlich grünes Licht (509 nm) aussenden (Cubitt, 1995). Dieser Prozess ist ohne weiteres *in vitro* nicht nachstellbar, weil in Lösung ausreichende GFP-Konzentrationen nicht erreicht werden können (Morise, 1974). Daher wurde ein Fusionsprotein aus *enhanced* (E)-GFP und Aequorin generiert, in dem EGFP und Aequorin über eine kurze Proteinschleife aus 50 Aminosäuren (pG5A) verbunden sind (Baubet, 2000). Dieses Fusionsprotein ist in der Lage, Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration anzuzeigen, was durch die Messung der EGFP-Emission nach vorhergehender Beladung des Aequorins mit Coelenterazin H detektiert werden kann.

Etwa 5×10^6 Mrg-Rezeptor stabil-ko-exprimierende HEK293-Ae-Zellen (vgl. Tabelle 4.4) werden einen Tag vor der Messung auf 100 mm-Petrischalen ausgesät. Das Medium wird abgesaugt und die Zellen werden für 25 Minuten bei RT mit 5 μM Coelenterazin H (in HEPES-*buffered saline*, HBS/BSA-Puffer) beladen. Diese Lösung wird abgesaugt, die Zellen werden mit 2 ml PBS/EDTA vom Boden abgelöst und mit 10 ml HBS-Puffer in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation für 3 Minuten bei 800 x g wird der Überstand dekantiert, die Zellen werden in HBS-Puffer resuspendiert und auf 1×10^5 Zellen pro 80 μl eingestellt. Sodann werden 80 μl der Zellsuspension pro Loch in eine 96-Loch-Platte mit weißem Boden überführt. In dieser Platte wird die totale Lumineszenz über die Zeit mit einer Frequenz von 1 Hz gemessen

(FluoStar Omega). Der FluoStar Omega ist dabei in der Lage, über zwei unabhängige Pumpensysteme zum gewünschten Zeitpunkt ein definiertes Volumen in das gerade vermessende Loch zu injizieren. Dabei werden die jeweiligen Liganden als 5-fach-konzentrierte Lösung (verdünnt in HBS-Puffer) in die Pumpe gegeben und von dieser Lösung werden 5 Sekunden nach Beginn der Messung 20 µl pro Loch injiziert. Die resultierenden Messwerte werden zunächst gegen die Zeit aufgetragen, nachdem der erste gemessene Wert auf 100 % normiert worden ist. Aus den resultierenden Kurven wird mittels des Programms Prism 5.0 (GraphPad Software Inc., La Jolla, USA) die Fläche unter der Kurve (*area under the curve*, AUC) bestimmt, wobei die untere Grenze der Fläche eine Parallele zur Abszisse bei 100 % auf der Ordinate darstellt, und im Rahmen dieser Arbeit als Ca^{2+} -Signal bezeichnet. Wegen der großen Zahlenwerte werden Ca^{2+} -Signale immer in Flächeneinheiten (FE) x 1000 angegeben.

Ca^{2+} -Signale aus Konzentration-Wirkungskurven werden in Abhängigkeit von der logarithmisch aufgetragenen Ligandenkonzentration dargestellt und mit einem Algorithmus, der einen sigmoidalen Kurvenverlauf zu Grunde legt, angenähert, so dass die Potenz anhand der ermittelten EC_{50} -Werte und die intrinsische Effizienz anhand der E_{max} -Werte von verschiedenen Ligand-Rezeptor-Paaren verglichen werden kann (vgl. Abschnitt 3.1.3). Dabei wurde ein EC_{50} -Wert nur dann angegeben, wenn R^2 , ein Maß für die Genauigkeit der Regression, einen Wert von 0,8 überschritt.

Zur Messung der hMrgX1-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation in primären Spinalganglienneuronen werden $2,5 \times 10^3$ Zellen auf 96-Loch-Platten kultiviert und nach 6 Tagen mit je 250 ng pG5A und pcDNA4-hMrgX1 und PromoFektin transfiziert. Nach 20 Stunden werden die Zellen mit Coelenterazin H beladen und nach einmaligem Waschen in HBS-Puffer wird die Ca^{2+} -Mobilisation analog zum Vorgehen in HEK293-Ae-Zellen analysiert.

<u>HBS-Puffer:</u>	<u>HBS/BSA-Puffer:</u>
2 mM CaCl_2	HBS-Puffer
5,5 mM Glukose	0,1 % BSA (w/v)
10 mM HEPES	
5 mM KCl	
140 mM NaCl	
1 mM MgCl_2	
pH 7,4	

4.2.3.2.2 Fura2 als molekularer Ca^{2+} -Detektor

Fura2 ist ein fluoreszierender Ca^{2+} -Ionenchelator (K_D 250 nM), der in Abhängigkeit von der Ca^{2+} -Konzentration seine Anregungseigenschaften ändert, während seine

Emissionscharakteristika unverändert bleiben (Grynkiewicz, 1985). So liegt die maximale Anregung in Ca^{2+} -freier Lösung bei 365 nm, diese sinkt jedoch bei kompletter Sättigung mit Ca^{2+} -Ionen auf eine Anregungswellenlänge von 340 nm ab. Diese Eigenschaft ermöglicht es damit, bei alternierender Anregung mit 340 bzw. 380 nm, semi-quantitativ auf Änderungen der Ca^{2+} -Konzentration zurückzuschließen, wenn reziproke Änderung der Emission in beiden Fluoreszenzkanälen gemessen werden. Beispielsweise würde eine Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in einer erhöhten Fluoreszenz nach Anregung mit 340 nm und ebenso in einer verminderten Fluoreszenz nach Anregung mit 380 nm resultieren (vgl. Abbildung 4.4, links). Indem der Quotient aus der Fluoreszenzintensität nach Anregung mit 340 nm und derer nach Anregung mit 380 nm gebildet wird, wird eine solche Messung zudem unabhängig von wenig zu beeinflussbaren Faktoren wie der Fura2-Menge oder der Detektorempfindlichkeit des Fluorimeters (vgl. Abbildung 4.4, rechts).

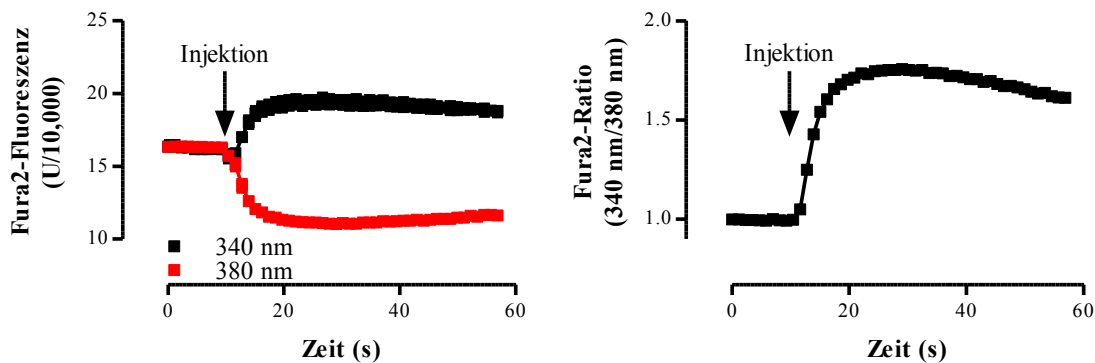


Abbildung 4.4: Exemplarische Fura2-Fluoreszenzmessungen

Links: Die Fura2-Fluoreszenz bei Anregung mit 340 nm (schwarze Kurve) oder 380 nm (graue Kurve) ist gegen die Zeit aufgetragen. Dabei wurde ein GPCR-Ligand injiziert, der intrazellulär zu einer Ca^{2+} -Mobilisation führte. Rechts: Der Quotient der beiden Fluoreszenzkurven der linken Seite wurde berechnet und gegen die Zeit aufgetragen.

Als geladenes Molekül ist Fura2 sehr schlecht membrangängig, daher wird es als Acetoxy-methylester (Fura2-AM) zur Beladung von Zellen eingesetzt. Dieser Ester gelangt in seiner ungeladenen Form über die Zellmembran, wird intrazellulär von Esterasen mit breitem Substratspektrum gespalten und ist damit nach dem Ionenfallenprinzip in der Zelle „gefangen“. Die Aufnahme des Esters wird durch Zugabe geringer Mengen Pluronic F-127 (Maruyama, 1989, Owen, 1988) weiter verbessert, indem transiente Poren in der Membran generiert werden, durch die Fura2-AM-Moleküle leichter in das Zytoplasma permeieren können. Pluronic F-127 wurde für alle Experimente mit F11- und LAD2-Zellen eingesetzt, da diese sich schlechter mit Fura2-AM beladen ließen, nicht jedoch für alle anderen hier untersuchten Zelllinien.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde mit Hilfe von Fura2 in zwei unterschiedlichen experimentellen Ansätzen Veränderungen der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration gemessen. Zum einen unter Einsatz eines Fluoreszenzmikroskopes auf der Ebene

einzelner, adhärenz wachsender Zellen (Imaging), zum anderen unter Einsatz des oben schon erwähnten Loch-Platten-Lesegerätes FluoStar Omega auf der Ebene einer gesamten Zellpopulation, welche sich in Suspension befindet.

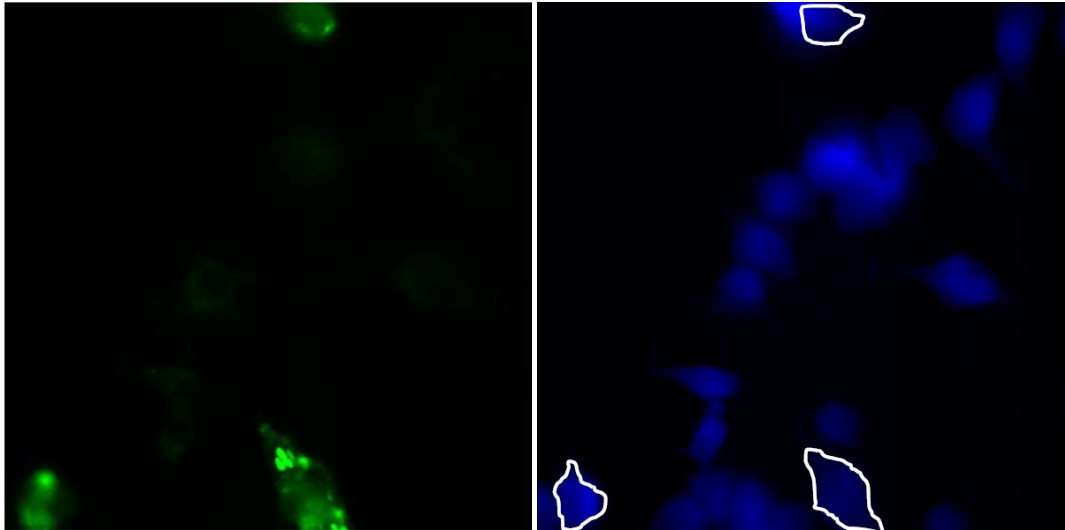


Abbildung 4.5: Beispielhafte YFP- und Fura2-Fluoreszenz von TRPV1-YFP-exprimierenden F11-hMrgX1-Zellen

Der TRPV1-YFP wurde in F11-hMrgX1-Zellen exprimiert. Linke Seite: Zunächst wurde die YFP-Fluoreszenz (Anregung: 485 nm; Emission: 530 nm) detektiert. Rechte Seite: Nun wurde die Fura2-Fluoreszenz (Anregung: 360 nm, Emission: 510 nm) detektiert. Die YFP-positiven Zellen wurden durch eine weiße Umrandung markiert.

Neben der Analyse von Ca^{2+} -Signalen einzelner Zellen bietet das Imaging zusätzlich die Möglichkeit, andere Fluoreszenzeigenschaften der untersuchten Zellen zu bestimmen, solange die genutzten Fluorophore aufgrund wenig überlappender Anregungs- und Emissionseigenschaften kompatibel sind. Dies ausnutzend wurden in dieser Arbeit hMrgX1-induzierte Veränderungen der Ca^{2+} -Konzentration in An- oder Abwesenheit des Ionenkanals TRPV1 in F11-hMrgX1-Zellen untersucht. Diese Zellen exprimieren den TRPV1 nicht endogen, können jedoch mit geeigneten eukaryotischen Expressionskonstrukten (vgl. Tabelle 4.2) transfiziert werden, um den TRPV1 rekombinant zu exprimieren. Diese Konstrukte kodieren jeweils für Fusionsproteine des TRPV1 mit dem Fluoreszenzprotein YFP, welches bei einer Wellenlänge von 485 nm, nicht aber bei 340/380 nm, der Fura2-Anregungswellenlängen, zur Fluoreszenz angeregt wird. Die Transfektionseffizienz betrug etwa 20 bis 50 %, so dass, basierend auf dem Vorhandensein oder dem Fehlen der YFP-Fluoreszenz (Abbildung 4.5), TRPV1-positive und TRPV1-negative F11-hMrgX1-Zellen simultan vermessen werden konnten. Dies hatte den Vorteil, dass die gleichen Lösungen zur Stimulation verwendet und somit Verdünnungsfehler oder andere unkontrollierbare Effekte ausgeschlossen werden konnten.

Einen Tag vor dem Ca^{2+} -Imaging-Experiment werden 4×10^4 Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete Deckgläschen in 6-Loch-Platten ausgesät. Am Tag des

Experimentes wird das Medium von den Zellen gesaugt und die Zellen werden für 30 Minuten bei 37 °C mit Fura2-AM beladen, indem sie mit 1 ml Fura2-AM-Lösung inkubiert werden. Diese Lösung wird sodann von den Zellen abgesaugt und durch zwei Waschschriffe mit 2 ml HBS-Puffer komplett entfernt. Bis zur eigentlichen Messung werden die Zellen bei RT in HBS-Puffer verwahrt. Ein Deckgläschen wird dann in eine Messkammer eingespannt, die auf einem IX-71 (Olympus) invertierten Fluoreszenzmikroskop über einem 40-fach-vergrößernden Ölimmersionsobjektiv positioniert wird. Die Zellen werden sodann mit 200 µl HBS-Puffer überschichtet. Mit Hilfe der mitgelieferten Software Vision 5.0 (Till Photonics, Gräfelfing) wird ein Monochromator so angesteuert, dass die Zellen alternierend mit 340 nm und 380 nm bei einer Frequenz von 2 Hz angeregt werden. Über eine iXON-Digitalkamera (Andor, Belfast, Nord-Irland) wird parallel dazu die Fura2-Emission aufgezeichnet. 50 Sekunden nach Beginn der Messung werden die Zellen durch manuelle Zugabe von 200 µl einer 2-fach-konzentrierten Ligandenlösung (verdünnt in HBS-Puffer) stimuliert. Nach der Messung wird digital der Messhintergrund in beiden Fluoreszenzkanälen subtrahiert, der Quotient 340 nm/380 nm gebildet und die mittlere Fluoreszenzintensität einzelner Zellen im jeweiligen Kameraausschnitt extrahiert. Der erste gemessene Wert einer Zelle wird auf 100 % normiert. Diese Daten werden sodann in Prism 5.0 importiert und gegen die Zeit dargestellt. Als quantitatives Maß für den Vergleich verschiedener experimenteller Gruppen dient die AUC ab dem Injektionszeitpunkt mit einer Parallelen zur Abszisse bei 100 % auf der Ordinate als unterer Grenze. Dieser, als Ca^{2+} -Signal bezeichnete Wert, wird in FE x 1000 angegeben. Diese Ca^{2+} -Signal wird für jede Zelle einzeln bestimmt. In der jeweiligen Abbildungsbeschriftung ist die Gesamtzahl gemessener Zellen angegeben. Diese entstand immer aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen des gesamten Experimentes.

Ein Tag vor einer Ca^{2+} -Messung im Loch-Platten-Lesegerät werden 3 bis 5 x 10⁶ Zellen auf 100 mm-Petrischalen ausgesät. Am Tag des Experimentes wird das Medium von den Zellen gesaugt und die Zellen werden für 30 Minuten bei 37 °C mit Fura2-AM beladen, indem sie mit 5 ml Fura2-AM-Lösung inkubiert werden. Diese Lösung wird sodann von den Zellen abgesaugt und die Zellen werden mit 2 ml PBS/EDTA vom Boden abgelöst und mit 10 ml HBS-Puffer in 15 ml Zentrifugenröhren überführt. Nach einer Zentrifugation für 3 Minuten bei 800 x g wird der Überstand dekantiert, die Zellen werden in HBS-Puffer resuspendiert und auf 1 x 10⁵ Zellen pro 80 µl eingestellt. Sodann werden 80 µl der Zellsuspension pro Loch in eine 96-Loch-Platte mit durchsichtigem Boden und weißen Wänden überführt. In dieser Platte wird im FluoStar Omega die Fura2-Fluoreszenz nach alternierender Anregung mit 340 nm und 380 nm über die Zeit mit einer Frequenz von 0,86 Hz gemessen. 10 Sekunden nach Beginn der Messung werden 20 µl pro Loch einer 5-fach-konzentrierten Ligandenlösung (verdünnt in HBS-Puffer) automatisch injiziert. Auch hier wird die Fura2-Ratio berechnet, auf den

ersten gemessenen Wert normiert und die erhaltenen Daten werden gegen die Zeit dargestellt. Konzentration-Wirkungskurven werden veranschaulicht und analysiert (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.1). Als quantitatives Vergleichsmaß diente ebenso die AUC, die als Ca^{2+} -Signal bezeichnet und in FE angegeben wurde.

Fura2-AM-Lösung:

HBS/BSA-Puffer

5 μM Fura2-AM

eventuell 0,02 % Pluronic F-127 (w/v)

4.2.3.3 Messung von Ionenkanalaktivität mittels Mn^{2+} -induziertem Fura2-Quenching

Viele Ca^{2+} -leitende Ionenkanäle weisen auch für andere divalente Kationen, darunter Mn^{2+} -Ionen, hohe Leitfähigkeiten auf. Fura2 ist nicht nur ein Ca^{2+} -Chelator, sondern kann viele divalente Kationen, u. a. Mn^{2+} -Ionen, binden. Im Gegensatz zu einer Veränderung der Anregungseigenschaften nach Ca^{2+} -Bindung führt die Mn^{2+} -Bindung zu einer Inhibition (Quenching) der Fura2-Emission. Dieser Umstand kann experimentell ausgenutzt werden, wenn man berücksichtigt, dass intrazellulär praktisch keine freien Mn^{2+} -Ionen vorkommen, diese aber exogen zugegeben werden können und dann in Abhängigkeit von der Aktivität Mn^{2+} -leitender Ionenkanäle in die Zelle einströmen. Weiterhin macht man sich den Umstand zu Nutze, dass die Fura2-Fluoreszenz bei 360 nm, dem Ca^{2+} -unabhängigen isosbestischen Punkt, gemessen werden kann und so spezifisch die Aktivität $\text{Ca}^{2+}/\text{Mn}^{2+}$ -leitender Ionenkanäle während einer ablaufenden GPCR-induzierten Ca^{2+} -Mobilisation aus dem ER anzeigt. So wird durch die Messung der Abnahme der Fura2-Fluoreszenz nach gleichzeitiger, exogener Zugabe von Mn^{2+} -Ionen und geeigneten Liganden Ionenkanalaktivität messbar gemacht (vgl. Abbildung 4.6).

Die Messungen des Mn^{2+} -induzierten Fura2-Quenching werden auch an einem Fluoreszenzmikroskop auf Ebene einzelner Zellen durchgeführt. Die Zellen werden auf Deckgläschen vorbereitet und in die Messkammer eingespannt (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2). Im Gegensatz zum Ca^{2+} -Imaging wird beim Mn^{2+} -induzierten Fura2-Quenching nur mit 360 nm angeregt und parallel dazu die Fura2-Fluoreszenz aufgezeichnet. Da der Prozess des Quenching sehr schnell ist, wird die Messfrequenz auf 4 Hz erhöht. Die Zellen werden durch manuelle Zugabe einer 2-fach-konzentrierten Ligandenlösung stimuliert, allerdings werden hier 500 μM MnCl_2 zum HBS-Puffer zugesetzt. Nach der Messung wird digital der Messhintergrund subtrahiert und die mittlere Fluoreszenzintensität einzelner Zellen im jeweiligen Kameraausschnitt extrahiert. Der erste gemessene Wert einer Zelle wird auf 100 % normiert. Diese Daten werden sodann in Prism 5.0 importiert und gegen die Zeit dargestellt. Zum quantitativen

Vergleich der TRPV1-Sensibilisierung dient die Differenz zwischen Agonist-induziertem Fura2-Quenching und basalem Fura2-Quenching gleichförmig vorbehandelter experimenteller Gruppen. Zum quantitativen Vergleich der TRPV1-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor dient die Differenz zwischen Fura2-Quenching am Ende der Messung und basalem Fura2-Quenching direkt vor der Injektion. In beiden Fällen wird das jeweilige quantitative Vergleichsmaß für jede Zelle einzeln bestimmt. In der jeweiligen Abbildungsbeschriftung ist die Gesamtzahl gemessener Zellen angegeben. Diese entstand immer aus mindestens drei unabhängigen Wiederholungen des gesamten Experimentes.

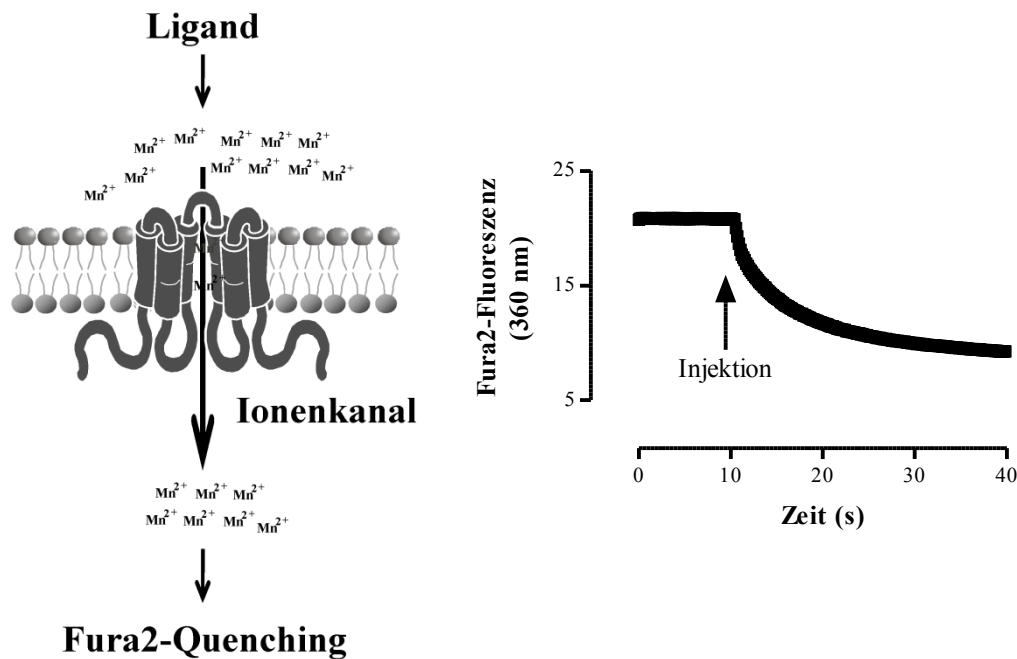


Abbildung 4.6: Prinzip und exemplarisches Beispiel des Mn^{2+} -induzierten Fura2-Quenching

Links: Bei gleichzeitiger Applikation von Mn^{2+} -Ionen und eines Ionenkanalliganden werden durch den aktivierten Ionenkanal Mn^{2+} -Ionen ins Zytoplasma geleitet. Dort binden sie Fura2 und inhibieren dessen Fluoreszenz (Quenching). Rechts: Die Fura2-Fluoreszenz nach Anregung mit 360 nm ist gegen die Zeit aufgetragen. Es wurden Mn^{2+} -Ionen und ein Ionenkanalligand injiziert, was zu einer Abnahme der Fura2-Fluoreszenz führte.

4.2.3.4 Messung der Phosphorylierung oder Expression von Protein

Viele Proteine werden durch Phosphorylierung oder Dephosphorylierung in ihrer Aktivität beeinflusst. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Aktivierung der MAPK Erk-1/2 durch den Nachweis der Phosphorylierung von Tyrosin 204 bzw. 187 mittels eines hoch-spezifischen Antikörpers (vgl. Abschnitt 4.1.4.1) im Immunoblot detektiert. Weiterhin wurde die Phosphorylierung einer nachgeschalteten Zielstruktur, des Transkriptionsfaktors *E twenty-six-like transcription factor 1* (ELK-1), an Serin 383 ebenso nachgewiesen.

Außerdem wurde die Veränderung der Expression des *immediate early gene* (IEG) *early growth response protein 1* (EGR-1) durch einen Antikörper (vgl. Abschnitt 4.1.4.1) gegen das totale EGR-1-Protein untersucht.

4.2.3.4.1 Herstellung von Proteinlysat

Nach der Methode von Laemmli (Laemmli, 1970) können Zellen aufgeschlossen und die enthaltenen Proteine gleichzeitig denaturiert werden. Dies wird zum einen durch Natriumdodecylsulfat (*sodium dodecyl sulfate*, SDS), welches Proteine unter Maskierung ihrer Ladungen entfaltet, und zum anderen durch β -Mercaptoethanol, welches vorhandene Disulfidbrücken reduziert und somit zum Auflösen der Tertiär- und Quartärstrukturen von Proteinen beiträgt, bewerkstelligt.

Im Rahmen dieser Arbeit werden 2 Tage vor Herstellung von Proteinlysat Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete 6-Loch-Platten ausgesät (F11-Zellen: 1×10^5 Zellen pro Loch, HEK293-Zellen: 5×10^5 Zellen pro Loch), um am folgenden Tag nach einmaligem Waschen für 24 Stunden in Serum-freien Medium inkubiert zu werden. Danach wird für die angegebenen Zeiten mit dem jeweiligen Liganden stimuliert. Zur Beendigung der Stimulation werden die 6-Loch-Platten auf Eis gestellt und sofort mit 2 ml eiskaltem PBS pro Loch gewaschen. Im Anschluss werden die Zellen durch Zugabe von Laemmli-Puffer (F11-Zellen: 100 μ l, HEK293-Zellen: 200 μ l) lysiert. Das Lysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt, durch eine Behandlung von 10 Sekunden mit Ultraschall weiter aufgeschlossen und bis zur Analyse bei -20°C gelagert.

Laemmli-Puffer:

0,025 % Bromphenolblau (w/v)

5 % Glycerin (v/v)

1 % SDS (w/v)

15 mM Tris/HCl

1,25 % β -Mercaptoethanol (w/v)

pH 6,8

4.2.3.4.2 Polyacrylamidgelelektrophorese

Mit SDS denaturierte Proteinproben können in einem diskontinuierlichen Polyacrylamidgel durch Anlegen einer Spannung nur anhand ihres Molekulargewichtes aufgetrennt werden. Ein diskontinuierliches Gel besteht aus einem oberen Sammelgel und einem unteren Trenngel. Im Sammelgel wird das gesamte aufgetragene Protein in einem kleinen Volumen konzentriert, indem der pH-Wert, die Ionenstärke und die Porengröße im Vergleich zum Trenngel vermindert vorliegen. Im Trenngel erfolgt dann

die eigentliche Auftrennung nach dem Molekulargewicht. Sie wurde, entsprechend einer bestmöglichen Auftrennung im gewünschten Größenbereich, optimal für Erk-1/2 (42/44 kDa) und ELK-1 (48 kDa, je 10 % Acrylamid-Anteil) oder EGR-1 (82 kDa, 8 % Acrylamid-Anteil) eingestellt.

Proteinlysate wird vor dem Auftragen auf das Polyacrylamidgel für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, um die Denaturierung der Proteine besonders stringent zu gestalten. Unlösliche Bestandteile werden sodann durch Zentrifugation für 5 Minuten bei 17.000 x g sedimentiert. Aus dem Überstand werden 30 µl auf ein Gel aufgetragen. Die Elektrophorese wird durch Anlegen einer Spannung von 80 V gestartet. Sobald die blaue Lauffront das Trenngel erreicht hat, wird die Spannung auf 120 V erhöht. Um eine bestmögliche Auftrennung zu gewährleisten, wird die Elektrophorese erst gestoppt, sobald die 25 kDa-Bande des mitgeführten Größenstandards (vgl. Abschnitt 4.1.5) soeben aus dem Trenngel herauslief.

<u>Sammelgellösung:</u>	<u>Trenngellösung:</u>	<u>SDS-Laufpuffer:</u>
125 mM Tris/HCl	375 mM Tris/HCl	2,5 mM Tris/HCl
0,1 % SDS (w/v)	0,1 % SDS (w/v)	0,01 % SDS (w/v)
4 % Rotiphorese Gel 30	10 % Rotiphorese Gel 30	19 mM Glycin
100 µL APS (10 %)	100 µL APS (10 %)	
20 µL TEMED	20 µL TEMED	
pH 6,8	pH 8,8	

4.2.3.4.3 Immunoblot

Die aufgetrennten Proteine können im Immunoblot-Verfahren durch Anlegen einer Spannung senkrecht zur Laufrichtung des Gels auf eine Nitrozellulosemembran transferiert und dort immobilisiert werden. Dazu wurde die Methode von Towbin genutzt (Towbin, 1979), ein sog. halbtrockenes Verfahren (*semi-dry*). Die Transfereffizienz kann durch die reversible Anfärbung der Proteine auf der Membran mit Ponceau S überprüft werden. Auf dieser Membran kann sodann durch Immunoblot die gewünschte Proteinphosphorylierung mittels hoch-spezifischer Antikörper (vgl. Abschnitt 4.1.4) untersucht werden, nachdem vorher unspezifische Bindestellen durch Inkubation mit Milchpulver abgesättigt wurden. Beim Immunoblot wird das gewünschte Epitop zunächst durch einen Primärantikörper gebunden, dessen F_c-Teil wiederum von einem sekundären, HRP-konjugierten Antikörper erkannt wird. Schließlich wird die Chemilumineszenz des, durch HRP katalysierten Umsatzes von Luminol unter Verbrauch von H₂O₂ mit einer sensitiven Kamera gemessen und digitalisiert (ChemiSmart 5000, Peqlab). Durch eine densitometrische Analyse mit dem Programm ImageJ (*National Institutes of Health*, Bethesda, USA) können schließlich semi-quantitative Aussagen über die untersuchte Proteinphosphorylierung bzw.

Proteinexpression getroffen werden. Dafür ist die gleichmäßige Proteinbeladung eines Gels unerlässlich. Dies wurde zum einen dadurch gewährleistet, dass immer nur Proben der selben 6-Loch-Platte, also solche, die zur gleichen Zeit ausgesät und lysiert wurden, verglichen wurden. Zum anderen wurden Membranen bei der Untersuchung der Proteinphosphorylierung nach der Entwicklung im ChemiSmart 5000 mit Strip-Puffer inkubiert, um über eine massive Verminderung des pH-Wertes die Antikörper-Antigen-Bindung zu zerstören und damit die gebundenen Antikörper von der Membran abzulösen. Nach dieser Prozedur wurden unspezifische Bindestellen erneut mit Milchpulver blockiert. Nachfolgend wurde durch den Nachweis der unveränderten Expression von Erk-1/2 eine Lade- und Transferkontrolle durchgeführt. Bei der Untersuchung der EGR-1-Proteinexpression wurde die Membran nach dem Proteintransfer horizontal geschnitten, so dass im unteren Teil über den Nachweis der unveränderten Expression von Erk-1/2 direkt eine Lade- und Transferkontrolle durchgeführt werden konnte, während im oberen Teil die Veränderung der EGR-1-Expression analysiert werden konnte.

Bei der Transferkammer für den Immunoblot handelt es sich um ein vertikales Transfersystem, bei dem die Kathode nach unten orientiert ist. Auf die Kathode werden zunächst 9 Filterpapiere, getränkt in Kathoden-Puffer gelegt. Danach folgen das Gel sowie die Nitrozellulosemembran, welche in Anode-II-Puffer getränkt werden. Schließlich folgen 3 Filterpapiere, getränkt in Anode-II-Puffer, und 6 Filterpapiere, getränkt in Anode-I-Puffer. Um einen gleichmäßigen Transfer zu gewährleisten, werden nach der Positionierung dieser Komponenten Luftblasen aus dem System entfernt. Der Transfer wird durch eine konstante Stromstärke ($0,8 \text{ mA/cm}^2$) für 4 Stunden vollzogen. Die Membran wird sodann für 3 Minuten in Ponceau S-Lösung inkubiert und kurz mit ddH₂O gewaschen. Bei erfolgreichem Transfer wird die Membran dreimal für 10 Minuten mit *Tris-buffered saline Tween* (TBST) gewaschen, bevor unspezifische Bindestellen für 30 Minuten mit 5 % Milchpulver (w/v in TBST) blockiert werden. Anschließend wird über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper inkubiert (vgl. Abschnitt 4.1.4.1 für Verdünnungen in 3 % Milchpulver in TBST). Am nächsten Tag werden ungebundene Antikörper durch Waschen mit TBST (3 x 10 Minuten) entfernt, bevor für 1 Stunde bei RT mit dem sekundären Antikörper inkubiert wird (vgl. Abschnitt 4.1.4.3 für Verdünnungen in 3 % Milchpulver in TBST). Nach weiteren drei Waschschritten für 10 Minuten mit TBST erfolgt die Entwicklung im ChemiSmart 5000. Dafür werden Substratlösung S1 und S2 gleichteilig gemischt und für 30 Sekunden mit der Membran inkubiert. Diese wird dann zwischen zwei Folien positioniert, um sie vor Austrocknung zu schützen, und im ChemiSmart 5000 entsprechend der vorliegenden Signalstärke belichtet (5 bis 15 Minuten). Die Signale werden densitometrisch analysiert (ImageJ), auf eine geeignete Ladekontrolle normiert und relativ zu nicht stimulierten Zellen dargestellt.

Material und Methoden

<u>Ponceau S-Lösung:</u>	<u>Anode-I-Puffer:</u>	<u>Anode-II-Puffer:</u>	<u>Kathoden-Puffer:</u>
0,1 % Ponceau S	0,3 M Tris/HCl	25 mM Tris/HCl	40 mM 6-Aminohexansäure
5 % Essigsäure (v/v)	20 % MeOH (v/v)	20 % MeOH (v/v)	20 % MeOH (v/v)
pH 10,4	pH 10,4	pH 10,4	pH 7,6
<u>TBST:</u>	<u>Strip-Puffer:</u>	<u>S1-Lösung:</u>	<u>S2-Lösung:</u>
10 mM Tris/HCl	100 mM Glycin	0,1 M Tris/HCl	0,1 M Tris/HCl
150 mM NaCl	pH 2,0	0,02 % H ₂ O ₂	250 µM Luminol
0,05 % Tween (v/v)		pH 8,5	400 µM 4-Hydroxymzimtsäure
pH 7,4			pH 8,5

4.2.3.5 Quantitative PCR

Die quantitative PCR bietet methodisch die Möglichkeit, transkriptionell bedingte Expressionsunterschiede einzelner Gene auf mRNA-Ebene zu untersuchen. Dafür wird der DNA-interkalierende Fluoreszenzfarbstoff Sybr Green I eingesetzt, welcher nur bei Bindung an DNA fluoresziert. Mit dem 96-Loch-Platten-basierenden LightCycler® 480 der Firma Roche (Mannheim), einem Thermozykler und Fluorimeter in einem Gerät, kann in jedem PCR-Zyklus am Ende der Elongationsphase die Sybr Green I-Fluoreszenz detektiert werden. Unter Annahme idealer Amplifikationsbedingungen wird in jedem Zyklus die Anzahl an DNA-Molekülen, begrenzt durch beide Primer, verdoppelt. Zunächst wird der Anstieg doppelsträngiger DNA nicht detektiert werden, da die spezifische Sybr Green I-Fluoreszenz noch unterhalb der Detektionsgrenze des Fluorimeters liegt. Sobald diese Schwelle überschritten wird, ergibt sich ein linearer Anstieg der Fluoreszenz mit steigender Zykluszahl, der allerdings zunehmend abflacht und in einem Plateau endet (vgl. Abbildung 4.7, oben). Das Abflachen der Amplifikationskurve liegt u. a. an einer zunehmend verminderten Stabilität der DNA-Polymerase und einem Verbrauch an Desoxyribonukleotiden für die DNA-Elongation.

Das Überschreiten der Hintergrundfluoreszenzschwelle kann mittels der LightCycler® 480 Software ermittelt werden und wird als *Crossing Point* (Cp) angegeben. Vergleicht man nun das Eintreten dieses Ereignisses (angegeben in PCR-Zyklen) zwischen zwei experimentellen Gruppen, so ist eine Verminderung des Wertes um n Zyklen einer Erhöhung der nachzuweisenden mRNA um $2^{(n-1)}$ Moleküle gleichzusetzen. Um auf eventuelle Unterschiede in der Menge der eingesetzten Probe zu normieren, wird parallel zur mRNA des Zielgens die mRNA eines sog. Haushaltsgens, in dieser Arbeit die β -Aktin-mRNA, mit vermessen. Nach der $\Delta\Delta$ Cp-Methode wird dann zunächst der Cp-Wert für β -Aktin vom Cp-Wert des Zielgens innerhalb der gleichen Probe subtrahiert. Nun wird dieser Δ Cp-Wert von nicht stimulierten Zellen, er entspricht der basalen Expression des zu untersuchenden Gens, vom Δ Cp-Wert von stimulierten Zellen subtrahiert. Das Ergebnis, der $\Delta\Delta$ Cp-Wert, wird nun als Exponent

von 0,5 eingesetzt. Das Ergebnis entspricht der relativen Geninduktion, wobei ein Ergebnis von 1 einer unveränderten Genexpression entsprechen würde (Formel 4.1).

$$\text{mRNA-Expression} = 0,5^{(C_{\text{PZielgen}} - C_{\text{P}\beta\text{-Aktin}})_{\text{stimuliert}} - (C_{\text{PZielgen}} - C_{\text{P}\beta\text{-Aktin}})_{\text{basal}}} \quad 4.1$$

Die quantitative PCR benötigt als Matrize DNA und nicht mRNA. Daher kann mRNA, die durch eine modifizierte Phenol-Chloroform-Extraktion mittels Tri[®] Reagenz aus Zellen isoliert worden ist, nicht direkt in die quantitative PCR eingesetzt werden. Sie muss zunächst unter Einsatz einer reversen Transkriptase in cDNA umgeschrieben werden. Dazu wurde in dieser Arbeit ein Erststrang-cDNA-Synthesekit der Firma Fermentas nach Herstellerangaben genutzt. Insbesondere wurden hier Oligo(dT)₁₈-Primer als Ausgangspunkt für die reverse Transkription genutzt, so dass nach der Isolation der totalen zellulären RNA nur aus reifer mRNA, die sich durch einen Poly-A-Schwanz auszeichnet, cDNA synthetisiert werden kann.

Primer, die in dieser Arbeit für die quantitative PCR eingesetzt wurden, wurden mit dem Internet-basierenden Designprogramm *Universal ProbeLibrary Assay Design Center* (<https://www.roche-applied-science.com/sis/rtpcr/upl/index.jsp?id=UP030000>) der Firma Roche generiert. Dabei wurde, wenn möglich, darauf geachtet, dass beide Primer auf unterschiedlichen Seiten des Übergangs zweier Exone binden. Damit kann ausgeschlossen werden, dass durch eine potentielle Verunreinigung der Probe mit genomischer DNA diese und nicht die revers transkribierte cDNA in der PCR amplifiziert wird, da ein Amplifikat mit einem kompletten Intron aufgrund seiner Länge in der sehr kurzen Elongationszeit (hier 10 Sekunden) nicht komplett synthetisiert werden kann. Bei intronfreien Genen wurde zur Sicherheit eine reverse Transkription ohne reverse Transkriptase durchgeführt und kontrolliert, dass diese Probe in der quantitativen PCR kein von H₂O unterschiedliches Ergebnis liefert. Eine Liste mit allen eingesetzten Primern und deren Sequenzen findet sich in Anhang XI. Um schließlich beurteilen zu können, ob nicht doch Nebenprodukte in der PCR entstanden sind, wird nach Beendigung der Amplifikation eine sog. Schmelzkurve durchgeführt. Dafür wird die Temperatur kontinuierlich von 60 °C auf 95 °C erhöht und parallel die Sybr Green I-Fluoreszenz gemessen. Am Schmelzpunkt eines Amplifikats, also der Temperatur, bei der die Hybridisierungsenergie beider Einzelstränge die thermische Energie unterschreitet, nimmt die Fluoreszenz aufgrund der Dissoziation beider DNA-Stränge schlagartig ab (Abbildung 4.7, Mitte). Trägt man die Änderungsgeschwindigkeit der Fluoreszenz gegen die Temperatur auf (Abbildung 4.7, unten) fungiert der ermittelte Wert als eine Art Fingerabdruck für ein gewünschtes Amplifikat. Insbesondere sind Primerdimere aufgrund ihrer Kürze durch geringere Schmelztemperaturen gekennzeichnet und können so vom gewünschten Produkt unterschieden werden. In

jeder quantitativen PCR wurde daher zunächst die Schmelzkurve einer Probe analysiert, bevor der darin gemessene Cp-Wert in die Auswertung eingeschlossen wurde.

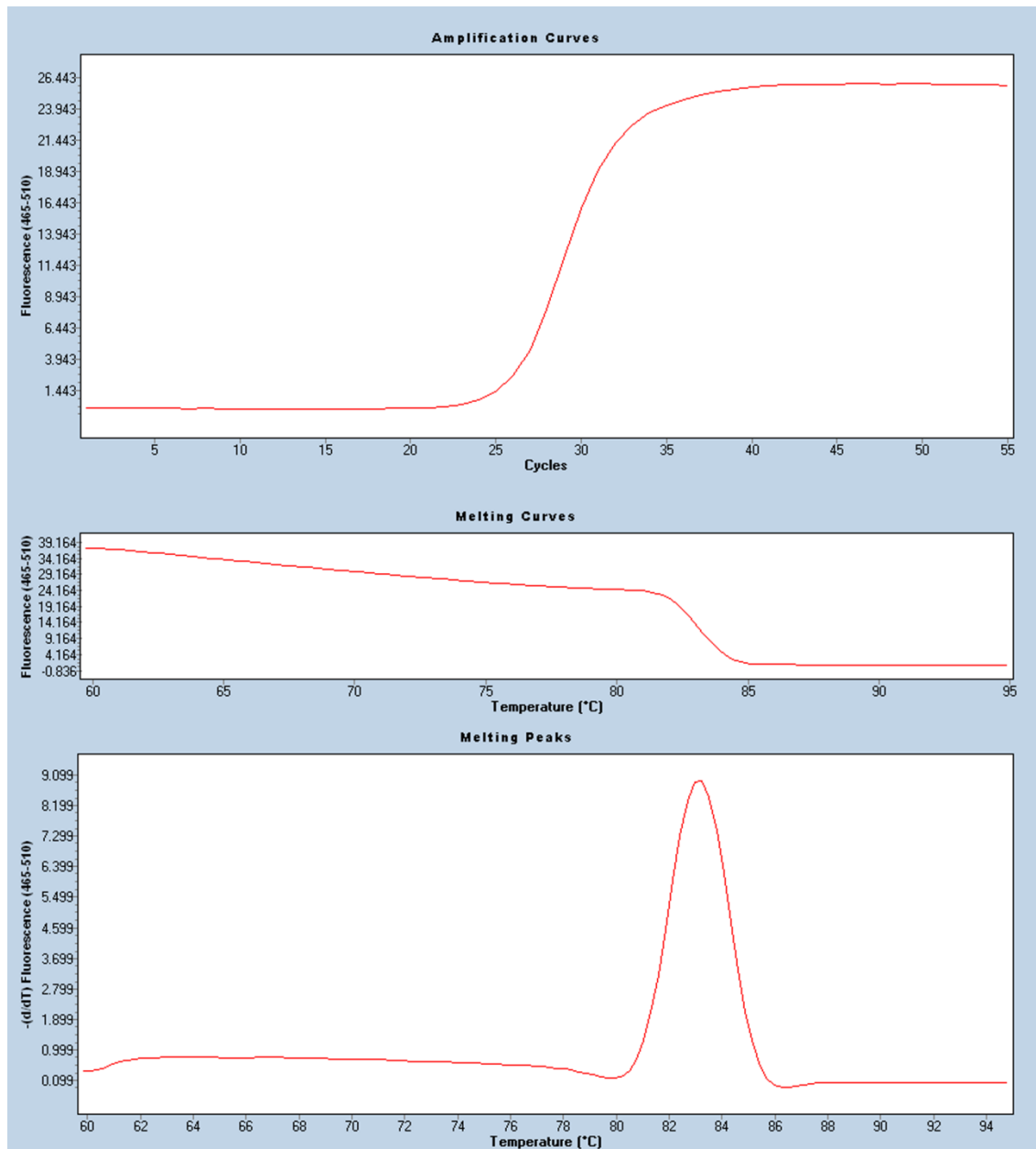


Abbildung 4.7: Exemplarische Amplifikations- und Schmelzkurve bei der quantitativen PCR

Oben: Mit dem LightCycler® 480 wird am Ende jeder Elongationsphase die Sybr Green I-Fluoreszenz gemessen. Aufgetragen gegen die Zykluszahl ist diese Fluoreszenz hier exemplarisch dargestellt. Mitte: Am Ende von 55 Amplifikationszyklen wird eine Schmelzkurve aufgenommen. Dabei wird die Temperatur sukzessive erhöht und kontinuierlich die Sybr Green I-Fluoreszenz detektiert. Eine dieser Schmelzkurven ist hier exemplarisch aufgetragen. Unten: In der Schmelzkurve (Mitte) wird rechnerisch zu jedem Punkt die Steigung ermittelt, sie ist während der ganzen Schmelzkurve negativ. Der Betrag dieser Steigung ist nun gegen die Temperatur aufgetragen. Die Temperatur maximaler Fluoreszenzabnahme, hier etwa 83 °C, ergibt dabei die ermittelte Schmelztemperatur.

2 Tage vor der RNA-Isolation werden 1×10^5 F11-hMrgX1-Zellen auf Poly-L-Lysin-beschichtete 6-Loch-Platten ausgesät. Primäre Spinalganglien neurone werden

entsprechend der vorgegebenen Wachstumsdichte ausgesät (vgl. Abschnitt 4.2.1.1). F11-hMrgX1-Zellen werden je nach Stimulationszeit für 20 Stunden (bei 6 h Stimulationszeit) oder für 24 Stunden (bei 1 h Stimulationszeit) mit Serum-freiem Medium inkubiert. Die Stimulation erfolgt dann mit den angegebenen Liganden in Serum-freiem Medium. Die primären Spinalganglienneurone werden nur für 1 Stunde in Serum-freiem Medium inkubiert, bevor sie für 8 Stunden stimuliert werden.

Nach der Stimulation wird das Medium von den Zellen gesaugt und die Zellen werden durch Zugabe von 1 ml Tri[®]-Reagenz durch pipettieren mit nachfolgender Inkubation für 5 Minuten bei RT lysiert. Das Lysat wird in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und nach Zugabe von 200 µl Chloroform für 15 Sekunden durch Vortex gemischt. Nach einer 3-minütigen Inkubation bei RT folgt eine Zentrifugation für 15 Minuten mit 18.000 x g bei 4 °C. Von der wässrigen, oberen Phase werden vorsichtig 300 µl in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt und die enthaltene RNA durch Zugabe von 400 µl Isopropanol gefällt. Eine Inkubation von 10 Minuten bei RT soll diesen Effekt verstärken, bevor die ausgefallene RNA durch Zentrifugation für 10 Minuten bei 21.400 x g und 4 °C sedimentiert wird. Nach einem Waschschrift mit 500 µl 70 %-igem Ethanol wird die RNA an der Luft getrocknet und in 20 µl ddH₂O aufgenommen. Der Lösungsvorgang wird durch eine 10-minütige Inkubation bei 55 °C beschleunigt, so dass direkt danach die RNA-Konzentration photometrisch vermessen werden kann.

Zur cDNA-Synthese werden 2 µg totale RNA eingesetzt. Die reverse Transkription wird mit dem *RevertAid H Minus First Strand cDNA* Synthesekit der Firma Fermentas folgendermaßen durchgeführt:

Pipettierschema

2 µg RNA

5 µM Oligo(dT)₁₈-Primer

ad 12 µl ddH₂O → 5 Minuten Inkubation bei 65 °C

4 µl 5x Puffer

1 mM dNTP-Mix

1 µl RNase-Inhibitor (20 U/µl)

1 µl H- reverse Transkriptase (200 U/µl)

→ 60 Minuten Inkubation bei 42 °C

→ 10 Minuten Inkubation bei 70 °C

Nach Beendigung der reversen Transkription werden die entstandenen cDNA-Lösungen mit ddH₂O 100-fach verdünnt und bis zur quantitativen PCR bei -20 °C gelagert. Ein quantitativer PCR-Ansatz besteht aus 8 µl der verdünnten cDNA, 10 µl 2-fach-konzentriertem Sybr Green I-Mastermix und 2 µl einer 10 µM Lösung beider

Primer. Im Mastermix sind dabei die DNA-Polymerase, Nukleotide, ein geeigneter Puffer sowie Sybr Green I enthalten. Folgendes Thermozyklerprotokoll wurde genutzt:

Thermozyklerprotokoll

95 °C	15 Minuten	X 55
95 °C	10 Sekunden	
55 °C	10 Sekunden	
72 °C	10 Sekunden	
60 - 95 °C	kontinuierlich	

4.2.3.6 Messung von transkriptioneller Regulation mit Reportergenkonstrukten

Mit Hilfe von Reportergenkonstrukten kann die Aktivierung eines spezifischen, Transkription regulierenden Signalweges identifiziert und analysiert werden. Die Transkription eines Gens wird häufig über die Zugänglichkeit eines Promoters für spezifische Transkriptionsaktivatoren oder -repressoren oder über eine Affinitätserhöhung dieser Proteine gegenüber dem Promoter moduliert. Transkriptionsfaktoren binden dabei an spezifische DNA-Konsensussequenzen. Sind solche DNA-Sequenzen bekannt, können sie zusammen mit einem einfach nachweisbaren Gen unter der Kontrolle eines basalen Promoter, bestehend u. a. aus einer TATA-Box, durch gentechnische Methoden in einen geeigneten Vektor kloniert werden (vgl. Abbildung 4.2). Werden Zellen nun mit einem solchen Vektor transfiziert, kann über die veränderte Expression des Reportergenproduktes auf den Aktivitätszustand des gegebenen Transkriptionsfaktors bzw. des Signalweges, der diesen Transkriptionsfaktor aktiviert, zurückgeschlossen werden (Alam, 1990). Als Reportergen wird häufig die Luziferase des Glühwürmchens eingesetzt. Die Luziferase ist ein Enzym, welches unter Verbrauch von ATP die Oxidation von Luziferin zu Oxyluziferin katalysiert. Bei dieser Reaktion werden Photonen frei, die in einem Luminometer detektiert werden können. Dabei ist die detektierte Lichtmenge linear abhängig von der Luziferasemenge und damit von der Reportergenaktivität. Ein Überblick über die hier eingesetzten Reportergenkonstrukte, sowie die so untersuchten Transkriptionsfaktoren findet sich in Tabelle 4.3.

3 Tage vor Beginn des Experimentes werden 2 bis 3×10^6 Zellen auf 100 mm-Petrischalen ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen mit 5 µg Reportergenkonstrukt transfiziert. Nach 24 Stunden werden die Zellen vom Boden der Petrischale abgelöst (vgl. Abschnitt 4.2.1.1) und so eine homogen transfizierte Zellpopulation generiert. Sodann werden 1×10^5 Zellen pro Loch auf Poly-L-Lysin-beschichtete 24-Loch-Platten ausgesät. Nach etwa 4 Stunden werden die Zellen einmal mit 1 ml Serum-freiem Medium pro Loch gewaschen und dann mit 0,9 ml Serum-freiem Medium inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgt die Stimulation der Zellen durch

Zugabe von 100 µl einer 10-fach-konzentrierten Ligandenlösung (verdünnt in Serum-freien Medium) und Inkubation für die jeweils angegebene Zeit bei 37 °C. Danach werden die Zellen in 100 µl Lysispuffer lysiert. 80 µl dieses Lysates werden auf eine 96-Loch-Platte mit weißem Boden überführt und die totale Lumineszenz wird im FluoStar Omega mit einer Frequenz von 1 Hz für insgesamt 10 Sekunden gemessen. Nach 1 Sekunde erfolgt die automatische Injektion von 20 bis 50 µl Luziferasesubstrat (Promega), um die oben erwähnte Licht emittierende Reaktion zu starten. Zur Quantifizierung des Transkription-modulierenden Effektes der Stimulation wird die maximale Lichtemission während der Messung extrahiert und als X-fache Reporteraktivität relativ zu nicht stimulierten Zellen dargestellt.

Bei NFAT- und SRE (*serum response element*)-abhängigen Reporterstudien in F11-hMrgX1-Zellen wird die Transfektion zur Erhöhung der Transkriptionseffizienz mit dem Neon[®]-Elektroporationsgerät durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.1.5.2). So transfizierten Zellen wird nach 24 Stunden das Serum entzogen und danach wird wie beschrieben fortgefahren.

Lysispuffer:

1 mM DTT

4 mM EGTA

8 mM MgCl₂

25 mM Tris/HCl

1 % Triton X-100 (v/v)

pH 7,4

4.2.3.7 Bestimmung von CCL2 in Zellkulturüberständen

CCL2 (*chemokine ligand 2*) gehört zur Gruppe der CC-Chemokine, wird von vielen Zellen des Immunsystems, u. a. Mastzellen des Bindegewebstyps, gebildet und besteht beim Menschen aus 74 Aminosäuren (Baghestanian, 1997, Burd, 1989). In dieser Arbeit wurde die Menge an CCL2 in Zellkulturüberständen der humanen Mastzelllinie LAD2 mittels eines ELISA (*Quantikine human CCL2 Immunoassay*) der Firma R&D Systems, Wiesbaden, nach Herstellerangaben nachgewiesen. Dieser Nachweis beruht auf dem Sandwich-ELISA-Prinzip, bei dem CCL2 in einem Zellkulturüberstand mittels eines Antikörpers, der auf dem Boden einer 96-Loch-Platte immobilisiert worden ist, gebunden wird. Das gebundene CCL2 wird dann mit einem weiteren Antikörper, an den die HRP konjugiert wurde, detektiert und über den Umsatz von Tetramethylbenzidin unter Verbrauch von H₂O₂ sichtbar gemacht.

2 x 10⁵ LAD2-Zellen werden in 180 µl Kulturmedium in 96-Loch-Platten ausgesät und durch Zugabe von 20 µl einer 10-fach-konzentrierten Ligandenlösung

(verdünnt in Kulturmedium) für 18 h bei 37 °C in Triplikaten stimuliert. Nach Ende der Stimulation werden die Zellen mit dem kompletten Überstand in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach einer Zentrifugation für 3 Minuten bei 2000 x g wird der Überstand in ein frisches 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Der Überstand wird nochmals zentrifugiert, um alle korpuskularen Bestandteile zu entfernen. 150 µl Überstand nach diesem Zentrifugationsschritt werden sodann auf je ein Loch der Antikörper-beschichteten 96-Loch-Platte gegeben und für 2 Stunden inkubiert. Zusätzlich wird aus einer definierten Menge von humanem CCL2 eine Standardreihe hergestellt und in Duplikaten ebenso analysiert, um später mittels einer Eichgerade die CCL2-Menge in den Zellkulturüberständen zu quantifizieren. Es folgen vier Waschschrte mit jeweils 300 µl des mitgelieferten Waschpuffers. Nun werden 200 µl der CCL2-Antikörper-HRP-Lösung zugegeben und für 1 Stunde inkubiert. Nach erneutem viermaligem Waschen wird die fertige Substratlösung durch gleichteilige Mischung einer stabilisierten H₂O₂-Lösung mit einer Tetramethylbenzidin-Lösung angesetzt. Von der Substratlösung werden 200 µl pro Loch eingesetzt. Nach 20 Minuten wird die Reaktion durch Zugabe von 50 µl 1 M Schwefelsäure abgestoppt. Das entstandene Produkt der HRP-katalysierten Reaktion hat sein Absorptionsmaximum bei 450 nm, so dass die OD bei dieser Wellenlänge im FluoStar Omega bestimmt wird. Zusätzlich wird die OD₅₇₀ bestimmt und die dort erhobenen Werte werden von der OD₄₅₀ subtrahiert. Diese Korrektur soll unspezifische Einflüsse, die aus Unregelmäßigkeiten in der Oberfläche der 96-Loch-Platte resultieren, herauskürzen. Schließlich wird aus den korrigierten Werten der Standardreihe eine Eichgerade ermittelt und mittels der errechneten Geradengleichung die CCL2-Konzentration in den untersuchten Zellkulturüberständen berechnet.

4.2.3.8 Elektrophysiologie

Mit elektrophysiologischen Methoden wird die Veränderung der Leitfähigkeit über eine biologische Membran gemessen, indem der Stromfluss zwischen einer Elektrode mit leitendem Zugang zum Zellinneren und einer zweiten Elektrode mit leitendem Zugang zur extrazellulären Lösung gemessen wird. Dabei wurde 1967 von Erwin Neher und Bert Sakmann die sog. *Patch Clamp*-Technik eingeführt (Neher, 1976), mit welcher der Leckstrom zwischen beiden Elektroden deutlich verringert werden kann. Dies wird durch den Einsatz einer sehr dünn ausgezogenen Glaskapillare mit einem Öffnungsdurchmesser von wenigen µm bewerkstelligt, in welcher sich die zum Zellinneren orientierte Elektrode befindet. Durch vorsichtiges Annähern der Kapillare an eine Zelle mittels eines Mikromanipulators und Applikation eines Unterdrucks beim ersten Kontakt von Kapillare und Zellmembran kann dann eine so enge Assoziation

zwischen Membran und Kapillare erzielt werden, dass der Widerstand für einen Leckstrom im GΩ-Bereich liegt und damit praktisch vernachlässigt werden kann.

Ist eine solche Adhärenz zwischen Membran und Kapillare hergestellt, kann durch kurzzeitige Applikation eines deutlich stärkeren Unterdrucks die Membran innerhalb der Öffnung der Kapillare (das *Patch*) aufgerissen werden. Dabei bleiben die seitliche Adhärenz zwischen Membran und Kapillare und der daraus resultierende Widerstand für einen Leckstrom erhalten. Somit erhält die Elektrode in der Kapillare einen leitenden Zugang zum Zellinneren und Ströme zwischen beiden Elektroden müssen im Wesentlichen über die Membran laufen. Da diese Ströme über die komplette Membranoberfläche einer Zelle laufen, spricht man auch von der Ganzzellkonfiguration, welche in dieser Arbeit durchgehend genutzt wurde.

Biologische Membranen weisen ein Ruhepotential auf, welches durch Energieabhängige Trennung von Ladungen auf beiden Seiten der Membran aufgebaut wird. Eine Veränderung des Potentials kann nur durch einen elektrischen Strom hervorgerufen werden, welcher mit elektrophysiologischen Methoden gemessen werden soll. Dazu ist ein komplizierter elektronischer Regelkreis (Verstärker mit virtueller Masse) erforderlich, mit dem das Membranpotential, trotz Strömen über die Membran, künstlich konstant gehalten wird (Spannungsklemme, *voltage clamp*). Bei diesem Regelkreis wird ein gewünschtes Membranpotential eingestellt und parallel dazu das momentane Potential gemessen. Bei einer Differenz zwischen beiden Potentialen wird durch Injektion eines Stromes über die Kapillarelektrode das wirkliche Potential in Richtung des gewünschten Potentials verändert. So kann mit einer Elektrode sowohl das Membranpotential konstant gehalten, als auch der Strom über die Membran zur Referenzelektrode gemessen werden. Diese Technik wurde in dieser Arbeit genutzt, um das Membranpotential in Form einer Spannungsrampe zu verändern und gleichzeitig resultierende Ströme aufzuzeichnen. Es wurden, ausgehend von einem Haltepotential von 0 mV, 50 ms andauernde Spannungsrampen von -100 mV bis +100 mV mit einer Frequenz von 0,5 Hz appliziert. Trägt man den gemessenen Strom einer Rampe gegen die Spannung auf, resultiert eine Strom-Spannungsbeziehung, die für einen Ionenkanal eine Art spezifischen Fingerabdruck darstellt.

2 Tage vor dem Experiment werden 4×10^4 F11-hMrgX1-Zellen auf 6-Loch-Platten ausgesät. Am folgenden Tag werden die Zellen mit 2 µg pcDNA3.1-TRPV1-YFP oder entsprechenden TRPV1-Mutanten transfiziert. 2 Stunden vor Beginn des Experimentes werden die Zellen auf Poly-D-Lysin-beschichtete Deckgläschen in 6-Loch-Platten replattiert. Ein Deckgläschen wird sodann aus der 6-Loch-Platte genommen, mit einem Tropfen Silikon auf dem Boden einer 40 mm-Petrischale fixiert und mit 2 ml HBS-Puffer überschichtet. Die Petrischale wird dann über einem invertierten Mikroskop auf einem schwingungsgedämpften Tisch positioniert. Glaskapillaren werden unter Erwärmung sehr dünn ausgezogen und durch Hitze poliert.

Diese Kapillaren (3 bis 5 M Ω Widerstand) werden mit intrazellulärer Lösung gefüllt und auf einem Elektrodenhalter arretiert. Unter mikroskopischer Kontrolle wird die Kapillare dann in den HBS-Puffer abgesenkt. Es folgt eine erste elektronische Korrektur der Kapazitäten im Messsystem, die zu diesem Zeitpunkt vor allem von der Glaskapillare herrühren. Mit einem Mikromanipulator wird die Kapillare nun an die Zelle herangefahren. Der erste Membrankontakt kann dabei am Computer verfolgt werden, da der Widerstand für einen, aus einem rechteckigen Spannungspuls resultierenden, Strom zwischen Kapillarelektrode und Referenzelektrode abrupt zunimmt. Sobald der erste Kontakt hergestellt ist, wird die Kapillare nicht mehr bewegt. Stattdessen wird Unterdruck angelegt, so dass die Membran etwas in die Öffnung der Kapillare gesaugt wird. Dieser Unterdruck wird bis zum Erreichen eines G Ω -Widerstandes zwischen Kapillarelektrode und Referenzelektrode aufrechterhalten. Es folgt eine zweite kapazitative Korrektur des Messsystems. Sodann wird durch kurzzeitige Applikation eines starken Unterdrucks die Membran innerhalb der Kapillaröffnung aufgerissen. Im so erreichten Ganzzellmodus wird eine letzte kapazitative Korrektur vorgenommen. Hier spielt die Kapazität der Zellmembran die entscheidende Rolle. Ab diesem Zeitpunkt wird mit dem Programm PatchMaster (Heka, Lambrecht) sofort das rampenförmige Spannungsprotokoll gestartet und parallel der Strom gemessen. Nach einer Minute wird für 90 Sekunden über ein Druckejektorsystem (MPCU-3 der Firma Lorenz) Ligandenlösung direkt über die gerade gemessene Zelle superfundiert und diese damit stimuliert. Nach Ausschalten des Ejektionsdrucks diffundiert der Ligand von der Zelle und verdünnt sich so in der gesamten extrazellulären Lösung. Pro Deckgläschen werden daher maximal zwei Zellen vermessen, um eine Voraktivierung durch Ligandenlösung einer vorher gemessenen Zelle auszuschließen. Aus den Messungen wird die Stromstärke in jeder Rampe bei ± 60 mV mit dem Programm FitMaster (Heka) extrahiert und im Programm IgorPro 6.2 (WaveMetrics, Lake Oswego, USA) gegen die Zeit aufgetragen. Zudem ist die Kapazität jeder gemessenen Zelle protokolliert worden. Sie ist ein Maß für die Zellgröße und dient der Berechnung der Stromdichte (Strom pro Fläche) einer jeden Rampe bei ± 60 mV, welche auch gegen die Zeit aufgetragen wird. Außerdem wird die Strom-Spannungsbeziehung vor Beginn der Stimulation und am Ende der Stimulation aufgetragen und so graphisch verglichen. Zur quantitativen Analyse wird der Mittelwert des Stroms bei ± 60 mV, gemessen in den letzten zehn Rampen vor der Stimulation, vom Mittelwert des Stroms bei ± 60 mV, gemessen in den zehn Rampen am Ende der Stimulation, subtrahiert und der resultierende Liganden-induzierte Strom zwischen den verschiedenen experimentellen Gruppen verglichen.

intrazelluläre Lösung:

120 mM CsGlutamat

10 mM HEPES

8 mM NaCl

1 mM MgCl₂

3,62 mM CaCl₂

10 mM EGTA

5 mM EDTA

2 mM MgATP

pH 7,20

4.2.3.9 Bestimmung der zellulären cAMP-Akkumulation

Der sekundäre Botenstoff cAMP wird intrazellulär von AC aus ATP gebildet und wirkt sich in vielfältiger Weise auf zelluläre Signalwege aus (vgl. Abschnitt 3.1.5.1). Nach einem Protokoll von Salomon (Salomon, 1974), modifiziert von Dumuis (Dumuis, 1988), kann die Produktion von cAMP nach metabolischer Markierung mit [³H]-Adenin über eine sequentielle Säulenchromatographie und anschließende Szintillationsmessung untersucht werden. Dafür werden Zellen mit [³H]-Adenin inkubiert, welches sie in den Stoffwechsel einschleusen und zu Tritium-markiertem ATP phosphorylieren. So markierte Zellen akkumulieren nach AC-Stimulation Tritium-markiertes cAMP, wenn zeitgleich der cAMP-Abbau durch Phosphodiesterasen mit 1-Isobutyl-1-methylxanthin (IBMX) blockiert wird. Nach einer Extraktion des Zytoplasmas mit eiskalter Trichloressigsäure wird auf Dowex-Resin-AG50-W-Säulen (8 % Quervernetzung) über eine Ionenaustauschchromatographie cAMP von ATP getrennt. Das Eluat dieser Säule wird sodann nach dem Prinzip einer Verteilungschromatographie über Aluminiumoxidsäulen (Al₂O₃) weiter aufgereinigt, wobei vor allem ungewünschte Nebenprodukte abgetrennt werden. Nach Elution von der zweiten Säule wird die Aktivität in der Lösung als Maß für die cAMP-Produktion der Zelle mittels Flüssigkeitsszintillationsmessung bestimmt. In dieser Arbeit wurde Forskolin (FSK), eine AC-stimulierende Substanz der Buntnessel (*Coleus forskohlii*), genutzt, um den zellulären cAMP-Spiegel anzuheben. Unter diesen Bedingungen sollte sodann die Aktivierung des G_{i/o}-gekoppelten CCR2 untersucht werden, die in einer Inhibition der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation resultieren sollte.

32 Stunden vor Beginn des Versuchs werden 1 x 10⁵ F11-hMrgX1-Zellen pro Loch auf Poly-L-Lysin-beschichtete 12-Loch-Platten ausgesät. Nach 4 bis 6 Stunden werden die Zellen mit 2 µCi/ml [³H]-Adenin (27,2 Ci/mmol) in Serum-freien Medium über Nacht markiert. Während der Markierung wird ein Teil der Zellen mit BAM8-22 (1 µM) für 20 Stunden vorstimuliert. Diese Lösung wird von den Zellen abgesaugt und

es werden 360 µl Serum-freies Medium mit IBMX (1 mM) auf die Zellen gegeben. Die Stimulation der Zellen wird sodann durch Zugabe von 40 µl einer 10-fach-konzentrierten Ligandenlösung gestartet. Diese Ligandenlösung enthält 50 µM FSK, so dass eine finale Konzentration von 5 µM erreicht wird. Die Stimulation wird für 30 Minuten bei 37 °C durchgeführt und durch Absaugen des Überstandes mit sofort anschließender Extraktion der zytoplasmatischen Fraktion durch Zugabe von 1 ml 5 %-iger Trichloressigsäure abgestoppt. Der komplette Überstand wird dann auf Dowex-Resin-Säulen, die zuvor mit 10 ml HCl (1 M) und 10 ml H₂O gewaschen worden sind, überführt. Nach einem Waschschrift mit 4 ml H₂O werden die Dowex-Resin-Säulen mit 10 ml H₂O direkt auf die Aluminiumoxidsäulen eluiert. Diese werden einmal mit 1 ml Imidazol (0,1 M) gewaschen und danach mit 5 ml dieser Lösung in Szintillationsgefäße eluiert. Nach Zugabe von 12 ml Szintillationsflüssigkeit wird die Tritium-abhängige Betastrahlung in einem Szintillationsmessgerät (WS1414, PerkinElmer) über 3 Minuten bestimmt und als Zerfälle pro Minute angegeben.

4.2.3.10 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie ist eine Technik, mit der lichtbrechende und Fluoreszenzeigenschaften einzelner Zellen in einer Zellsuspension analysiert werden können. Dafür werden einzelnen Zellen über einen Flüssigkeitshüllstrom fokussiert und durch eine Quarzküvette geleitet, in der sie einem Lichtstrahl aus Lasern verschiedener Wellenlänge ausgesetzt werden. Dieses Licht wird zum einen in Abhängigkeit von den optischen Eigenschaften einer Zelle gestreut. Dabei ist eine Streuung in flachem Winkel ein Maß für die Größe einer Zelle (*forward scatter*, FSC) und eine Streuung im rechten Winkel ein Maß für deren Granularität (*sideward scatter*, SSC). Zum anderen kann das Laserlicht zur Anregung von Fluoreszenzfarbstoffen genutzt werden, deren Fluoreszenzlicht nach Wellenlängen-abhängiger Auftrennung über einen komplizierten Strahlengang durch dichroische Spiegel und Filter (Abbildung 4.8) mit Photodioden detektiert und in ein digitales Signal umgewandelt werden kann. Solche Fluoreszenzfarbstoffe können beispielsweise an Antikörper konjugiert werden, so dass zelluläre Markerproteine nachgewiesen werden können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Durchflusszytometrie genutzt, um auf Proteinebene in F11-hMrgX1-Zellen die Induktion des CCR2 nach Stimulation mit BAM8-22 nachzuweisen. Dafür werden 1×10^5 F11-hMrgX1-Zellen 2 Tage vor Beginn des Experimentes auf 6-Loch-Platten ausgesät. Am nächsten Tag werden die Zellen nach einmaligem Waschen für 4 Stunden auf 0,9 ml Serum-freies Medium gesetzt. Nach 4 Stunden werden die Zellen durch Zugabe von 100 µl einer 10-fach-konzentrierten BAM8-22 Lösung (verdünnt in Serum-freien Medium, finale Konzentration 2 µM) für weitere 20 Stunden stimuliert. Danach wird das Medium von

den Zellen gesaugt und einmal mit 2 ml PBS gewaschen. Die Zellen werden nun mit 1 ml PBS/EDTA vom Boden abgelöst und mit 5 ml PBS in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Nach einer Zentrifugation von 3 Minuten bei 1000 x g wird der Überstand dekantiert, die Zellen werden in 0,5 ml PBS resuspendiert und in ein 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt.

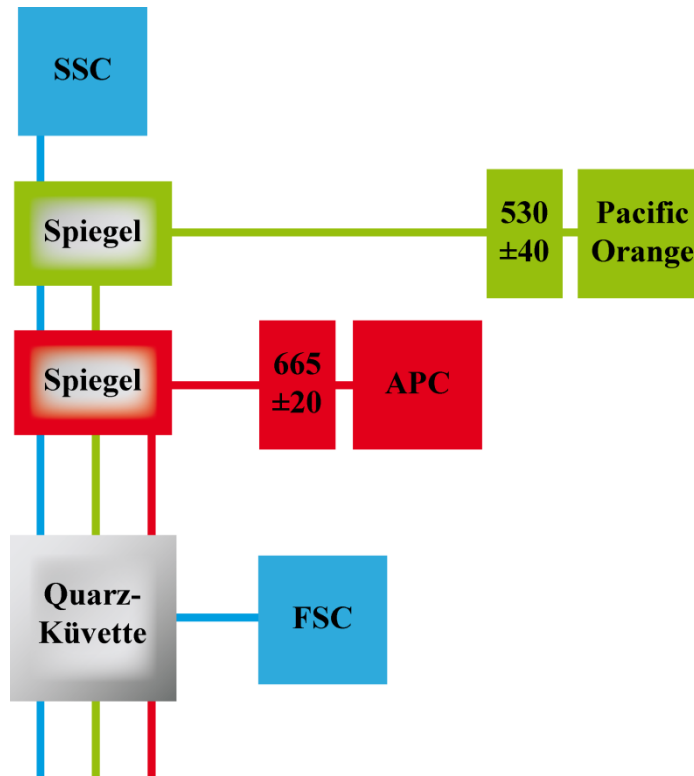


Abbildung 4.8: Übersicht über den Strahlengang im Durchflusszytometer

In der Quarzküvette erreicht das Einstrahlungslicht in Form von drei Laserlinien (488 nm, 405 nm, 642 nm) die zu messenden Zellen. In Abhängigkeit von Größe (FSC) oder Granularität (SSC) wird dieses Licht abgelenkt und in den entsprechenden Detektoren gemessen. Außerdem werden Fluoreszenzfarbstoffe angeregt. In dieser Arbeit wurde ein Vitalitätsmarker (konjugiert mit *Pacific Orange*) eingesetzt, sowie ein Anti-CCR2-Antikörper (konjugiert mit APC). Der Strahlengang ist nach dem Datenblatt des Durchflusszytometers CyAn™ ADP der Firma Beckman Coulter modifiziert worden.

Es folgt eine weitere Zentrifugation von 3 Minuten bei 2000 x g bevor der Überstand abgenommen und die Zellen in 100 µl Färbelösung aufgenommen werden. In der Färbelösung wird zuvor ein Allophycocyanin (APC)-konjugierter Antikörper gegen CCR2 verdünnt (vgl. Abschnitt 4.1.4.1 für Verdünnungen). Zur Kontrolle wird in einer weiteren Probe ein unspezifischer APC-konjugierter Antikörper des gleichen Isotyps, in diesem Fall IgG_{2B}, in der gleichen Verdünnung eingesetzt (vgl. Abschnitt 4.1.4.2). Die Zellen werden für 30 Minuten bei RT im Dunkeln mit diesen Lösungen inkubiert. Nach Zentrifugation (3 Minuten, 2000 x g) wird die Färbelösung abgezogen und die Zellen werden in 500 µl PBS/10 % FCS resuspendiert. Es folgt eine erneute Zentrifugation (3 Minuten, 2000 x g), bevor die Zellen in 300 µl PBS/10 % FCS aufgenommen werden und auf Eis zu einem CyAn™ ADP Durchflusszytometer (Beckman Coulter) in der

Neurologie des Klinikums Rechts der Isar (Technische Universität München) transportiert wurden. An diesem Gerät wurden die Zellen mit Hilfe von Frau Dipl. Hum.-Biol. Franziska Petermann vermessen.

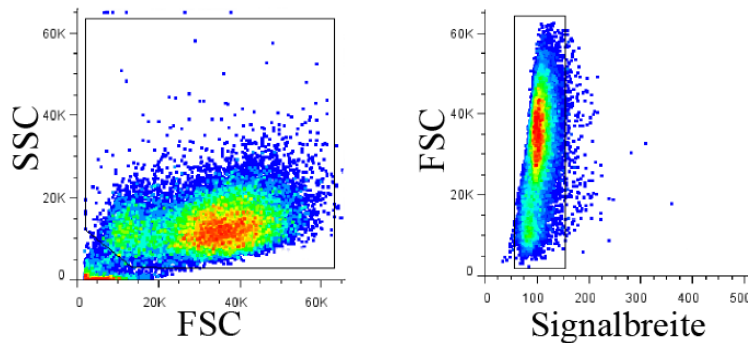


Abbildung 4.9: Ereignisauswahl am Durchflusszytometer nach Größe und Granularität

Links: Beispielhafte Darstellung der optischen Eigenschaften von Zellen bei einer Durchflusszytometrie. Aufgetragen ist der FSC als Maß für die Zellgröße gegen den SSC als Maß für die Zellgranularität. Die Farbkodierung gibt eine zunehmende Häufigkeit von blauer zu roter Farbe an. Der schwarze Kasten (Auswahl 1) beinhaltet die Ereignisse, die als Zellen definiert und damit weiter analysiert wurden. Rechts: Beispielhafte Darstellung der Zellen aus Auswahl 1 (links), wobei der FSC gegen die Signalbreite aufgetragen wurde. Der schwarze Kasten (Auswahl 2) gibt die Ereignisse an, die durch einzelne Zellen, und nicht durch zusammenhängende Zellaggregate, ausgelöst wurden.

Bei der Auswertung werden nur die Ereignisse als Zellen definiert, die eine gewisse Größe und Granularität überschritten haben (Abbildung 4.9 links, schwarzer Kasten). Somit sollen Zelltrümmer aus der Auswertung ausgeschlossen werden. Des Weiteren werden nur einzelne Ereignisse analysiert (Abbildung 4.9 rechts, schwarzer Kasten), da die Fluoreszenzmessung bei zwei zusammenhängenden Zellen, abgelesen an der Signalbreite, häufig fehlerhaft ist. In der Färbelösung wird, zusätzlich zum jeweiligen Antikörper, eine Amino-reaktive Chemikalie, die mit dem Fluoreszenzfarbstoff *Pacific Orange* (Invitrogen) konjugiert ist, eingesetzt, um lebende von toten Zellen zu unterscheiden. Dabei geht man davon aus, dass die Zellmembran toter Zellen nicht mehr intakt ist, so dass die Chemikalie auch mit Aminogruppen in der Zelle reagieren kann und damit deutlich höhere Fluoreszenzsignale von toten Zellen resultieren. Um dies zu überprüfen, wurden Zellen abgelöst und vor der Färbung in zwei Teile geteilt. Ein Teil wurde für 5 Minuten bei 95 °C inkubiert, um die Zellen thermisch abzutöten. Nun wurden beide Teile wieder vereint und das Protokoll wie beschrieben, allerdings ohne Zusatz eines Antikörpers zur Färbelösung, durchgeführt. In Abbildung 4.10 (links) ist gezeigt, dass so behandelte Zellen im Fluoreszenzkanal von *Pacific Orange* zwei Populationen zeigen, die obere entspricht dabei den toten Zellen. Mittels dieses Pilotexperimentes wurde eine maximal zulässige Fluoreszenz im Kanal von *Pacific Orange* festgelegt, bis zu der Zellen als lebend betrachtet und damit in die

Analyse der CCR2-Expression eingeschlossen wurden (Abbildung 4.10 rechts, schwarzer Kasten).

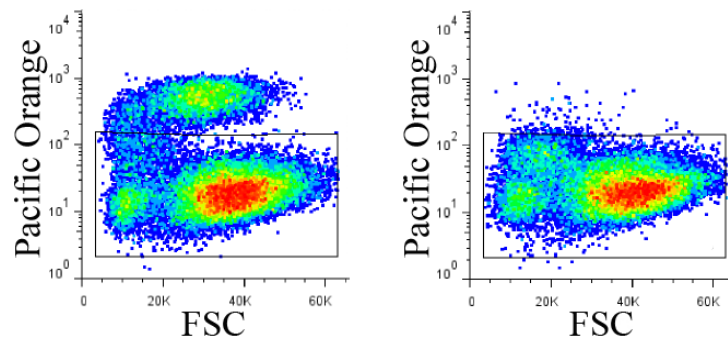


Abbildung 4.10: Unterscheidung von lebenden und toten Zellen im Durchflusszytometer

Darstellung der *Pacific Orange*-Fluoreszenz gegen den FSC von z. T. thermisch abgetöteten Zellen (links) und unbehandelten Zellen (rechts) aus einem Pilotexperiment. In beiden Fällen wurden nur Zellen aus der Auswahl 2 (vgl. Abbildung 4.9) dargestellt. Die Farbkodierung gibt eine zunehmende Häufigkeit von blauer zu roter Farbe an. Durch die teilweise Abtötung sind links Zellen mit höherer Fluoreszenz erkennbar, welche nicht im schwarzen Kasten liegen. Diese Zellen wurden als tot definiert. Ohne zusätzliche thermische Abtötung liegen rechts fast alle Zellen im schwarzen Kasten (Auswahl 3). Für die Quantifizierung der CCR2-Proteinexpression wurden nur Zellen aus der Auswahl 3 verwendet.

Nachdem mit den hier beschriebenen vier Kriterien einzelne, lebende Zellen der richtigen Größe und Granularität ausgewählt wurden, wird die Detektorempfindlichkeit im APC-Kanal mit Hilfe des unspezifischen, APC-konjugierten Antikörpers des gleichen Isotyps so eingestellt, dass der Anteil an Zellen mit einer höheren Fluoreszenz als 10 Fluoreszenzeinheiten deutlich kleiner als 1 % war. Diese Einstellungen werden nun nicht mehr verändert und es werden BAM8-22-stimulierte und nicht stimulierte Zellen verglichen. Angegeben wird schließlich der Anteil an APC- und damit CCR2-positiven Zellen bzw. deren Zunahme durch die Stimulation mit BAM8-22.

4.2.4 Statistische Methoden

Im Rahmen dieser Arbeit wurden Experimente mindestens dreimal unabhängig voneinander wiederholt. Die genaue Anzahl an Wiederholungen ist dabei in den jeweiligen Abbildungen oder Legenden angegeben. In einigen Experimenten wurden dabei innerhalb einer Wiederholung des Experimentes Mehrfachbestimmungen (Triplikate oder Quadruplikate) durchgeführt, deren Mittelwert als einzelner Wert in die Auswertung einer gesamten Experimentreihe eingeschlossen wurde. Aus solchen Experimentreihen wurde immer der Mittelwert und, als Maß für die Varianz, der Standardfehler des Mittelwertes berechnet und in geeigneter Weise dargestellt. Um zu analysieren, ob eventuelle Unterschiede zwischen verschiedenen experimentellen Gruppen rein zufällig auftraten, oder ob diese Unterschiede als signifikant unterschiedlich angesehen werden können, wurden verschiedene statistische

Hypothesentests mit dem Programm Prism 5.0 durchgeführt. Dabei ist das erreichte Signifikanzniveau durch geeignete Zeichen angegeben (z. B.: * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$). Als Test für zwei experimentelle Gruppen wurde ein ungepaarter, zweiseitiger *student's t-test* angewandt. Sobald mehr als zwei Gruppen verglichen wurden, wurde zunächst eine einfaktorielle Varianzanalyse durchgeführt. Nur bei signifikant unterschiedlichen Varianzen wurde der Post-Hoc-Signifikanztest nach Tukey genutzt, um einzelne experimentelle Gruppen paarweise miteinander zu vergleichen.

5 Ergebnisse

5.1 Pharmakologischer Vergleich zwischen dem hMrgX1-Rezeptor und den MrgC-Rezeptoren von Maus und Ratte

5.1.1 Etablierung von hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen

Der hMrgX1-Rezeptor wurde zeitgleich von zwei unterschiedlichen Arbeitsgruppen um Dong und Lembo kloniert (Dong, 2001, Lembo, 2002). Schon in diesen ersten Arbeiten wurde klar, dass keine homologen Gene im Genom von Mäusen oder Ratten existieren. Auf der Aminosäuresequenz-basierenden Suche nach nah verwandten Genen in Nagetieren fiel der Blick auf die Mrg-Subfamilien A, B und C, welche in Primaten nicht vorkommen. Nach der Ermittlung von Expressionsprofilen engte sich die Kandidatensuche nach orthologen Genen auf die Subfamilien A und C ein. Lembo publizierte (Lembo, 2002) erste funktionelle Daten, die BAM-Peptide als hMrgX1-Agonisten auswiesen. Interessanterweise konnte gezeigt werden, dass MrgC-Rezeptoren aus Maus und Ratte auch durch BAM-Peptide aktiviert werden (Grazzini, 2004, Han, 2002). Außerdem sind eine Reihe von Arbeiten publiziert worden, in denen MrgC-Rezeptoren in Mäusen oder Ratten als Modellsystem für hMrgX1-Rezeptoren genutzt wurden (Chang, 2009, Chen, 2006, Grazzini, 2004, Hager, 2008, Hong, 2004, Ndong, 2009). Daher wurden mMrgC- und rMrgC-Rezeptoren auch in dieser Arbeit ausgewählt, um später zu identifizierende Signalwege des hMrgX1-Rezeptors vergleichend zu untersuchen und als Grundlage für potentielle tierexperimentelle Untersuchungen zu fungieren.

Bislang sind keine zellulären Systeme beschrieben, die sich durch eine endogene Proteinexpression von hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren auszeichnen. Zusätzlich sind auch keine Antikörper gegen die drei Rezeptoren kommerziell erhältlichen. Daher wurden zunächst alle drei Rezeptoren in den pcDNA4-HisMax-Vektor subkloniert, um deren heterologe Expression auf Proteinebene durch einen Antikörper gegen das, so mit dem N-Terminus des Rezeptors fusionierte, Xpress-Epitop nachzuweisen (vgl. Abschnitt 4.1.8.1). Zur heterologen, stabilen Expression wurde die leicht zu kultivierende Zelllinie HEK293 genutzt. In Abbildung 5.1 ist zu erkennen, dass in HEK293-hMrgX1-, HEK293-mMrgC- und HEK293-rMrgC-Zellen eine signifikant erhöhte Expression von Rezeptor-Xpress-Epitop-Fusionsproteinen an der Zelloberfläche im Vergleich zu nicht transfizierten HEK293-Zellen nachgewiesen werden konnte. Bei genauerer Betrachtung fällt auf, dass die Oberflächenexpression des hMrgX1-Rezeptors

Ergebnisse

($0,32 \pm 0,03$) diejenige der MrgC-Rezeptoren (mMrgC: $0,15 \pm 0,01$; rMrgC: $0,17 \pm 0,01$) etwa um das 2-fache übersteigt.

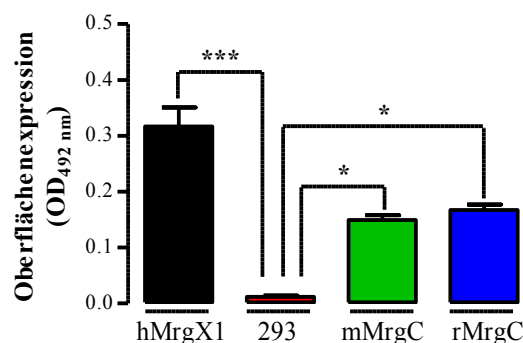


Abbildung 5.1: Oberflächenexpression von Xpress-Epitop-Rezeptor-Fusionsproteinen in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen

Nachweis von Xpress-Epitop-Rezeptor-Fusionsproteinen an der Zelloberfläche mittels ELISA in nicht transfizierten (293) HEK293-Zellen, oder in HEK293-hMrgX1-, -mMrgC- oder -rMrgC-Zellen. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Alle drei Rezeptoren sind in der Literatur als $G_{q/11}$ -koppelnde Rezeptoren beschrieben worden, so dass die Funktionalität der heterolog exprimierten Rezeptoren über die Agonisten-vermittelte Erhöhung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen nachgewiesen werden kann (Grazzini, 2004, Han, 2002, Lembo, 2002). Dieser funktionale Versuchsansatz kann auch genutzt werden, um Hinweise auf eine Konsequenz der unterschiedlichen Expressionsniveaus der verschiedenen Rezeptoren zu erhalten. Nach Beladung der Zellen mit dem Ca^{2+} -Farbstoff Fura2-AM (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2) wurde Puffer mit oder ohne den spezifischen Agonisten BAM8-22 injiziert.

In allen drei Mrg-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen, nicht aber in den parenteralen HEK293-Zellen, wurde durch BAM8-22 eine signifikante Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration ausgelöst, während die Injektion von Puffer zu keiner Veränderung der Ca^{2+} -Konzentration führte (Abbildung 5.2). Die Signalstärke in den drei verschiedenen Mrg-Rezeptor-exprimierenden Zellklonen variierte allerdings (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2 zur Quantifizierung des Ca^{2+} -Signals). In HEK293-hMrgX1-Zellen betrug das Ca^{2+} -Signal 1030 ± 128 , während in HEK293-mMrgC-Zellen nur ein Ca^{2+} -Signal von 574 ± 7 beobachtet werden konnte. Damit scheint die erhöhte hMrgX1-Expression an der Zelloberfläche (vgl. Abbildung 5.1) in einer vermehrten Signalweiterleitung zu resultieren. In HEK293-rMrgC-Zellen betrug das BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Signal nur 220 ± 6 . Diese weitere Abnahme der Ca^{2+} -Mobilisation gegenüber HEK293-mMrgC-Zellen könnte möglicherweise auf eine geringere Potenz von BAM8-22 am rMrgC-Rezeptor hindeuten (vgl. Abschnitt 5.1.2). Trotz dieser quantitativen Unterschiede in der Oberflächenexpression und Signalweiterleitung sind die hier etablierten zellulären Modellsysteme gut geeignet, um den hMrgX1-Rezeptor mit den MrgC-Rezeptoren pharmakologisch zu vergleichen, da hier in erster Linie die Potenz und Effizienz verschiedener Liganden am gleichen Rezeptor verglichen wird.

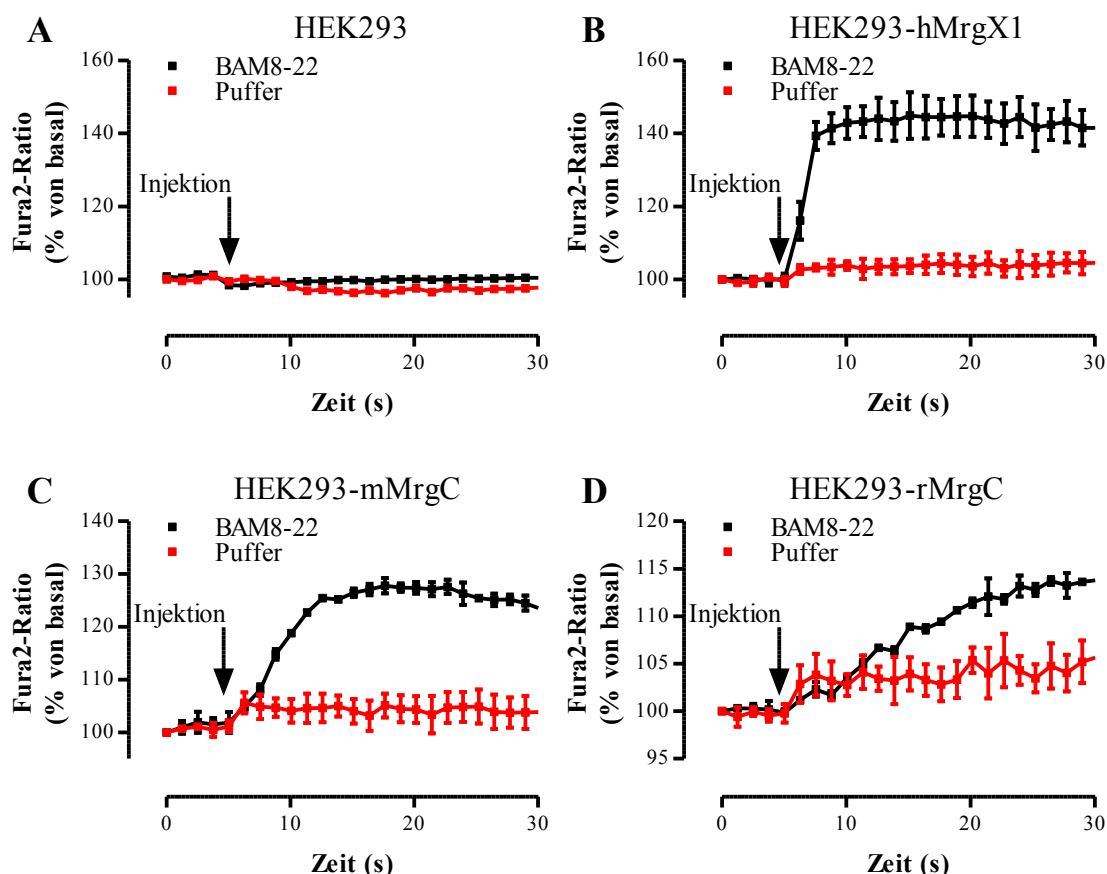


Abbildung 5.2: BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisation in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen

(A - D) Ca^{2+} -Signale in parenteralen HEK293- (A), HEK293-hMrgX1- (B), HEK293-mMrgC- (C) und HEK293-rMrgC-Zellen (D) nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von Puffer mit oder ohne BAM8-22 (1 μM). Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt und vergleichbare Befunde ermittelt. Davon ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

5.1.2 Konzentration-Wirkungskurven nach Fura2-AM-Beladung in HEK293-Zellen

Neben BAM8-22 wurden weitere peptiderge mMrgC-Rezeptoragonisten beschrieben, die aus unterschiedlichen Vorläuferproteinen entstehen (Han, 2002). So führen Spaltprodukte des POMC (γ_2 -MSH), des Prodynorphins (Dynorphin-14) und des Pro-NPFF_A (NPFF und NPAF) über die Aktivierung des mMrgC-Rezeptors zur Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration (vgl. Tabelle 3.3). Diese Befunde wurden partiell auch für den rMrgC-Rezeptor erhoben (Grazzini, 2004). Allerdings wurde bisher nur die Potenz verschiedener Agonisten verglichen, während die jeweilige intrinsische Effizienz noch nicht ermittelt wurde. Neben BAM-Peptiden wurden insbesondere POMC-Spaltprodukte in Nagetieren eingesetzt, um physiologische Funktionen der MrgC-Rezeptoren zu klären und auf den hMrgX1-Rezeptor zu übertragen (Chang, 2009, Chen, 2006, Grazzini, 2004, Hager, 2008, Hong, 2004, Ndong, 2009). Um beurteilen zu können, ob die so erhobenen Befunde valide auf das humane System übertragbar sind, ist es jedoch nötig, zunächst auf

Ergebnisse

zellulärer Ebene zu klären, ob hMrgX1-Rezeptoren auch durch die beschriebene Gruppe distinkter Agonisten aktiviert werden können und somit in ihrem pharmakologischen Ligandenprofil mit den MrgC-Rezeptoren übereinstimmen.

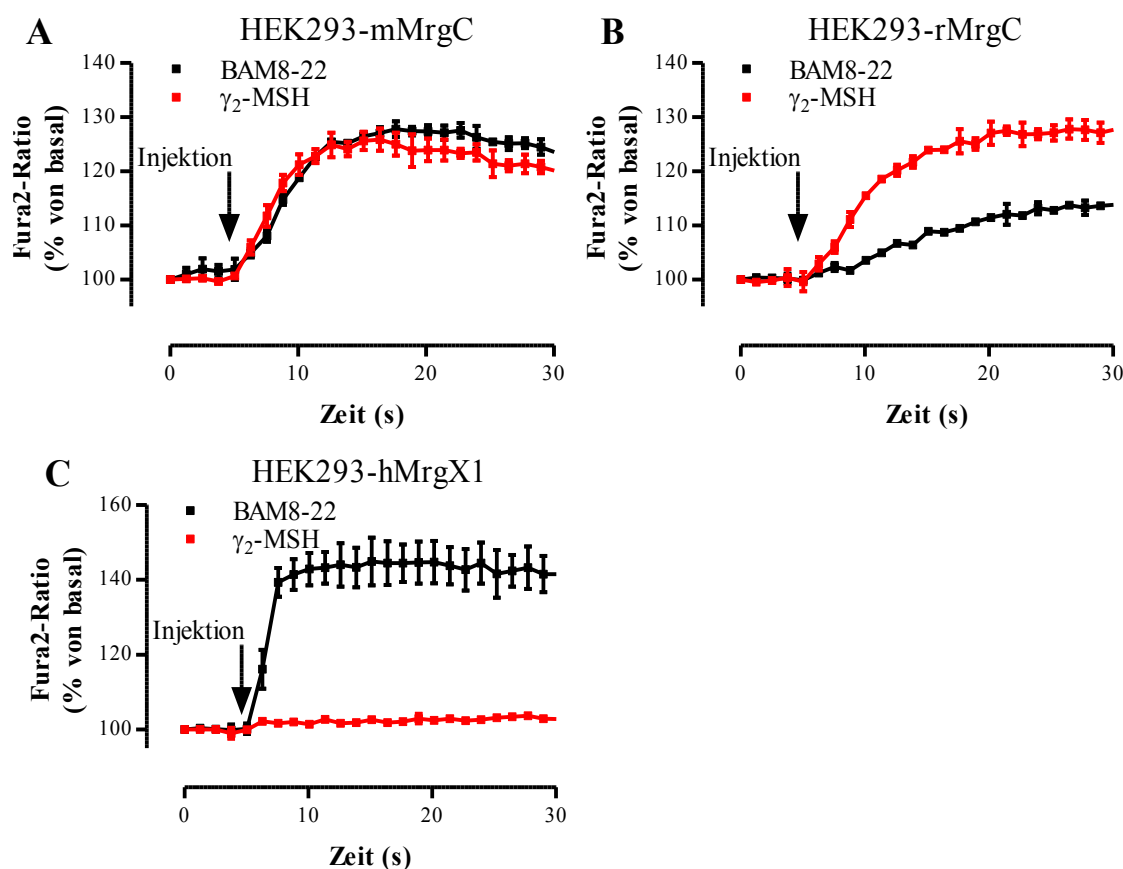


Abbildung 5.3: Ca^{2+} -Signale in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen (Fura2)

(A - C) Ca^{2+} -Signale in HEK293-mMrgC- (A), HEK293-rMrgC- (B) und HEK293-hMrgX1-Zellen (C) nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von BAM8-22 oder γ_2 -MSH (je 1 μM). Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt und vergleichbare Befunde ermittelt. Davon ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

Dazu wurden in dieser Arbeit die, in Abschnitt 5.1.1 beschriebenen, hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklone eingesetzt. Nach Beladung von HEK293-mMrgC-Zellen mit Fura2-AM wurden sowohl BAM8-22 als auch γ_2 -MSH injiziert. In Abbildung 5.3A wird deutlich, dass beide Peptide den mMrgC-Rezeptor gleich gut aktivieren können. Der rMrgC-Rezeptor (Abbildung 5.3B) wird durch γ_2 -MSH deutlich stärker aktiviert als durch BAM8-22. Bildet man den Quotienten aus den Ca^{2+} -Signalen nach Applikation von γ_2 -MSH und BAM8-22, ergibt sich eine etwa 2,5-fach stärkere rMrgC-Rezeptoraktivierung durch γ_2 -MSH. Dies war zu erwarten, da γ_2 -MSH in G_{qi5} ko-exprimierenden HEK293-rMrgC-Zellen etwa vier Mal potenter war als BAM8-22 (Grazzini, 2004). Im Vergleich dazu ergibt sich für den hMrgX1-Rezeptor ein komplett anderes Bild. Hier war im Gegensatz zu BAM8-22 keine Aktivierung durch γ_2 -MSH nachweisbar (Abbildung 5.3C). Somit zeigt sich ein erster deutlicher pharmakologischer Unterschied zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren.

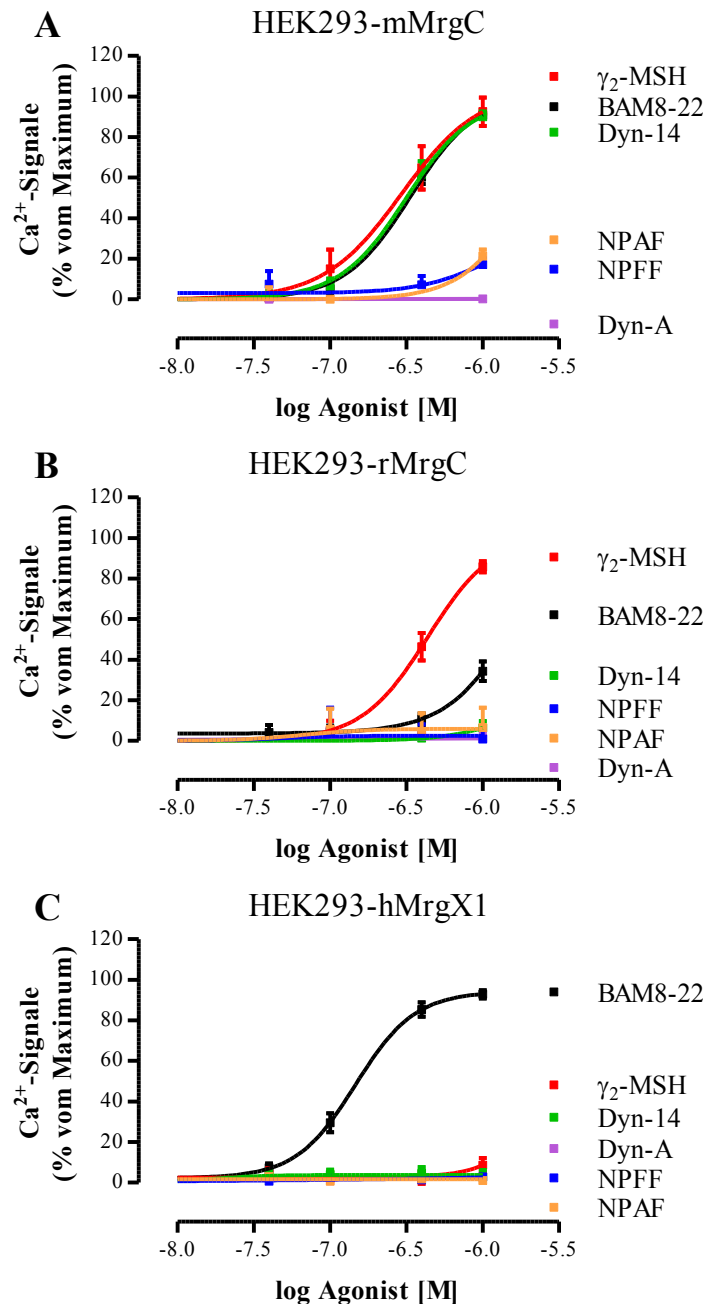


Abbildung 5.4: Ca²⁺-Konzentration-Wirkungskurven in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen (Fura2)

(A - C) Ca²⁺-Konzentration-Wirkungskurven in HEK293-mMrgC- (A), HEK293-rMrgC- (B) und HEK293-hMrgX1-Zellen (C) nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion der angegebenen Konzentrationen von BAM8-22, γ_2 -MSH, Dynorphin-14 (Dyn-14), Dynorphin-A (Dyn-A), NPFF oder NPAF. Zur Normierung wurde die maximale Antwort des effizientesten Liganden herangezogen. Mittels nicht-linearer Regression wurden Ausgleichskurven berechnet, aus denen sodann EC₅₀- und E_{max}-Werte (s. Tabelle 5.1) ermittelt werden konnten. Es wurden mindestens vier unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Ausgehend von diesen ersten Befunden wurden Konzentration-Wirkungskurven in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen aufgenommen. Dabei wurden BAM8-22, γ_2 -MSH, Dynorphin-14, Dynorphin-A, NPFF und NPAF jeweils in Konzentrationen zwischen 10 nM und 1 μ M eingesetzt (Abbildung 5.4). Zum Vergleich der unterschiedlichen Agonisten an einem Rezeptor wurde auf die maximale

Ergebnisse

Antwort normiert. Unter Annahme einer sigmoidalen Konzentration-Wirkungsbeziehung wurden mittels nicht-linearer Regression Ausgleichskurven berechnet, aus denen sodann EC_{50} - und E_{max} -Werte abgelesen werden konnten (vgl. Abschnitt 3.1.3). Diese charakteristischen Kenngrößen der verschiedenen Peptide an den drei Mrg-Rezeptoren, EC_{50} -Wert als Maß der Potenz und E_{max} -Wert als Maß der intrinsischen Effizienz, sind in Tabelle 5.1 zusammenfassend dargestellt. Es zeigte sich, dass γ_2 -MSH und BAM8-22 den mMrgC-Rezeptor äquipotent und äquieffizient aktivieren können. Dieses quantitative Ergebnis entspricht dabei den Erwartungen aus Abbildung 5.3.

Tabelle 5.1: EC_{50} - und E_{max} -Werte aus den, in Abbildung 5.4 dargestellten Ca^{2+} -Konzentrations-Wirkungskurven

Peptid		hMrgX1	mMrgC	rMrgC
BAM8-22	EC_{50} (μM)	$0,15 \pm 0,01$	$0,33 \pm 0,04$	$2,6 \pm 0,1$
	E_{max} (%)	100 ± 5	97 ± 6	34 ± 7
γ_2 -MSH	EC_{50} (μM)	-	$0,29 \pm 0,16$	$0,44 \pm 0,1$
	E_{max} (%)	keine Wirkung	100 ± 20	100 ± 19
Dynorphin-14	EC_{50} (μM)	-	$0,31 \pm 0,07$	-
	E_{max} (%)	keine Wirkung	96 ± 9	keine Wirkung
Dynorphin-A	EC_{50} (μM)	-	-	-
	E_{max} (%)	keine Wirkung	keine Wirkung	keine Wirkung
NPFF	EC_{50} (μM)	-	$R^2 < 0,8$	-
	E_{max} (%)	keine Wirkung	31 ± 12	keine Wirkung
NPAF	EC_{50} (μM)	-	$R^2 < 0,8$	-
	E_{max} (%)	keine Wirkung	29 ± 7	keine Wirkung

EC_{50} - (in μM) und E_{max} -Werte (in %) der hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptor-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisation (vgl. Abbildung 5.4) durch verschiedene Peptide (s. Spalte links) sind dargestellt.

Der rMrgC-Rezeptor wird durch γ_2 -MSH etwa fünf Mal potenter und deutlich effizienter aktiviert als durch BAM8-22. Auch dieses Ergebnis bestätigt den Anfangsbefund aus Abbildung 5.3. Der hMrgX1-Rezeptor wird im getesteten Konzentrationsbereich durch γ_2 -MSH gar nicht aktiviert, während BAM8-22 eine deutliche Ca^{2+} -Mobilisation auslösen kann. Für den mMrgC-Rezeptor stellte sich darüber hinaus heraus, dass ein drittes Peptid, Dynorphin-14, eine ähnliche Potenz und intrinsische Effizienz im Vergleich mit BAM8-22 und γ_2 -MSH aufweist ($EC_{50} \sim 300$ nM), während Pro-NPFF_A-Spaltprodukte bei hohen Konzentrationen partiell agonistisch wirken ($E_{max} \sim 0,3$) und Dynorphin-A den Rezeptor nicht aktiviert. Für den rMrgC-Rezeptor konnte neben BAM8-22 und γ_2 -MSH keine weitere Rezeptoraktivierung gemessen werden, während der hMrgX1-Rezeptor selektiv durch BAM8-22 aktiviert wird und kein anderes Peptid in der Lage ist, eine Ca^{2+} -Mobilisation auszulösen. Die errechneten EC_{50} -Werte sind gegenüber publizierten Daten aus $G\alpha_{q15}$ ko-exprimierenden HEK293-Zellen etwas höher (Grazzini, 2004, Lembo, 2002), stimmen aber mit Daten aus

anderen Zellsystemen, in denen keine G-Proteine ko-exprimiert wurden, gut überein (Burstin, 2006).

5.1.3 Konzentration-Wirkungskurven in Aequorin stabil-ko-exprimierenden HEK293-Zellklonen

Die, in Abschnitt 5.1.2 vorgestellten Daten, separieren den hMrgX1-Rezeptor aufgrund seiner pharmakologischen Eigenschaften deutlich von den MrgC-Rezeptoren von Maus und Ratte. Lembo gab in ihrer Erstbeschreibung des hMrgX1-Rezeptors einen EC_{50} -Wert von ~ 350 nM für die γ_2 -MSH-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisation in $G\alpha_{q15}$ ko-exprimierenden HEK293-hMrgX1-Zellen an (Lembo, 2002). In dieser Arbeit wurde jedoch keine Aussage über die Effizienz von γ_2 -MSH getätigt, so dass unter der Annahme, dass γ_2 -MSH im Vergleich zu BAM8-22 mit einer deutlich geringeren Potenz und Effizienz ausgestattet ist, die Möglichkeit bestand, mit einer Erhöhung der Messsensitivität eine γ_2 -MSH-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisation über den hMrgX1-Rezeptor nachzuweisen. Ausgehend von dieser Annahme wurden die hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklone mit dem Aequorin-kodierenden Plasmid pG5A (vgl. 4.2.1.6) transfiziert und durch nachfolgende Selektion doppelt stabil-exprimierende Zellklone generiert (HEK293-Ae-Zellen).

In diesen Zellen wurde nach Beladung mit dem Aequorinsubstrat Coelenterazin H zunächst die Aktivierung von hMrgX1/MrgC-Rezeptoren (Abbildung 5.5) mit BAM8-22 oder γ_2 -MSH gemessen (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.1). Im Vergleich mit der Messung der Ca^{2+} -Mobilisation mittels Fura2 konnten unter Einsatz von Aequorin 125-fach höhere Ca^{2+} -Signale nach Stimulation des hMrgX1-Rezeptors mit BAM8-22 gemessen werden (Fura2: 1030 ± 128 ; Aequorin: 124600 ± 33400), so dass von einer deutlich erhöhten Sensitivität dieses Versuchsansatzes auszugehen ist. Dennoch wurde der hMrgX1-Rezeptor nicht durch γ_2 -MSH aktiviert, während BAM8-22 zu einer deutlichen Ca^{2+} -Mobilisation führte (Abbildung 5.5C). Auch für den rMrgC-Rezeptor konnte das Bild der Fura2-abhängigen Messung der Ca^{2+} -Mobilisation bestätigt werden (Abbildung 5.5B). γ_2 -MSH führte zu einer Ca^{2+} -Mobilisation von 484 ± 36 , während BAM8-22 nur ein Ca^{2+} -Signal von 219 ± 28 auslöste. Damit entspricht das Verhältnis der γ_2 -MSH-vermittelten zur BAM8-22-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisation mit 2,2 den bisherigen Ergebnissen dieser Arbeit (vgl. Abschnitt 5.1.2). Die Aequorin-abhängige Bestimmung der Ca^{2+} -Mobilisation in den HEK293-mMrgC-Ae-Zellen (Abbildung 5.5A) ergab, dass γ_2 -MSH gegenüber BAM8-22, ähnlich wie am rMrgC-Rezeptor, eine höhere Effizienz aufweist (γ_2 -MSH: 193 ± 5 ; BAM8-22: 159 ± 8).

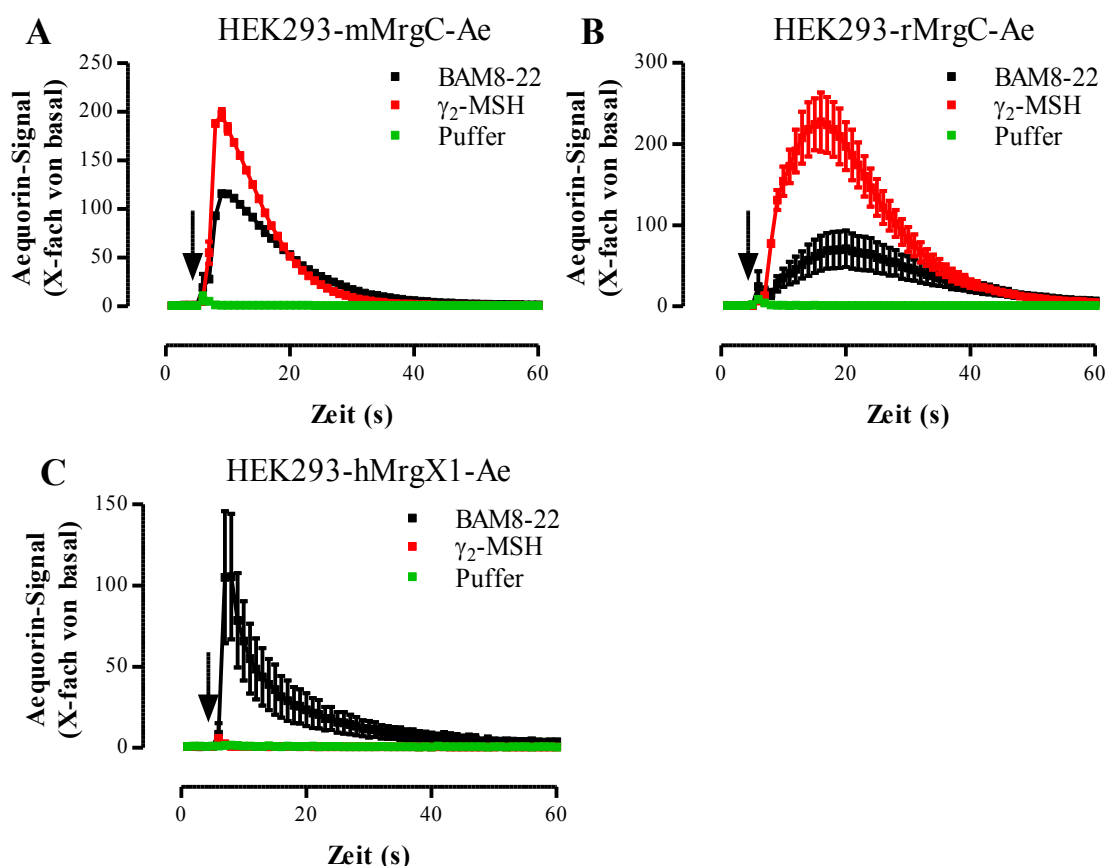


Abbildung 5.5: Ca^{2+} -Signale in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Ae-Zellklonen (Aequorin)

(A - C) Ca^{2+} -Signale in HEK293-mMrgC-Ae- (A), HEK293-rMrgC-Ae- (B) und HEK293-hMrgX1-Ae-Zellen (C) nach Beladung mit dem Aequorinsubstrat Coelenterazin H und Injektion von Puffer ohne oder mit BAM8-22 oder γ_2 -MSH (je 1 μM). Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt und vergleichbare Befunde ermittelt. Davon ist ein repräsentatives Experiment dargestellt.

In den zusätzlich durchgeführten Konzentration-Wirkungskurven (Abbildung 5.6 und Tabelle 5.2) zeigten sich am mMrgC-Rezeptor, im Vergleich mit Abschnitt 5.1.2, ähnliche Potenzen der verschiedenen Peptide (BAM8-22/ γ_2 -MSH/Dynorphin-14 > NPFF/NPAF), während sich die intrinsische Effizienz innerhalb der Gruppe der potentesten Agonisten zu unterscheiden scheint (Abbildung 5.6A). Dort ergab sich die Rangfolge γ_2 -MSH > BAM8-22 > Dynorphin-14. Möglicherweise ist dieser Befund durch die höhere Sensitivität der Messung intrazellulärer Ca^{2+} -Konzentrationen mittels Aequorin zu erklären. Am rMrgC-Rezeptor konnten die Fura2-basierenden Befunde bestätigt werden (Abbildung 5.6B). γ_2 -MSH und BAM8-22 stellen die einzigen relevanten Agonisten dar, wobei sich γ_2 -MSH durch eine deutlich höhere Effizienz gegenüber BAM8-22 auszeichnet. Diese Eigenschaft wird von beiden MrgC-Rezeptoren geteilt. Trotz der deutlich höheren Sensitivität des Aequorin-abhängigen Versuches konnten am hMrgX1-Rezeptor zusätzlich zu BAM8-22 keine weiteren Agonisten identifiziert werden (Abbildung 5.6C). Damit stellt die BAM8-22-selektive Aktivierung des hMrgX1-Rezeptors einen sehr deutlichen Unterschied zur Subfamilie der MrgC-Rezeptoren dar.

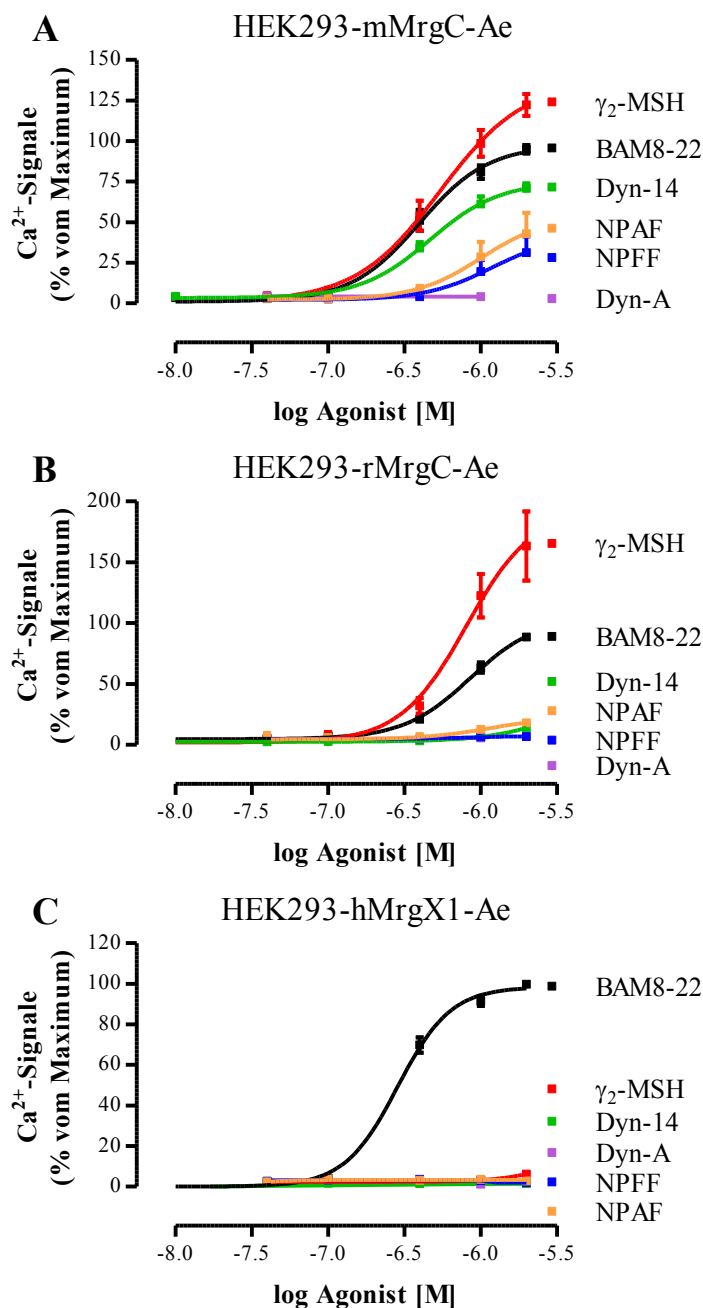


Abbildung 5.6: Ca²⁺-Konzentration-Wirkungskurven in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Ae-Zellklonen (Aequorin)

(A - C) Ca²⁺-Konzentration-Wirkungskurven in HEK293-mMrgC-Ae- (A), HEK293-rMrgC-Ae- (B) und HEK293-hMrgX1-Ae-Zellen (C) nach Beladung mit dem Aequorinsubstrat Coelenterazin H und Injektion der angegebenen Konzentrationen von BAM8-22, γ_2 -MSH, Dynorphin-14 (Dyn-14), Dynorphin-A (Dyn-A), NPFF oder NPAF. Zur Normierung wurde die maximale Antwort von BAM8-22 herangezogen. Mittels nicht-linearer Regression wurden Ausgleichskurven berechnet, aus denen sodann EC₅₀- und E_{max}-Werte (s. Tabelle 5.2) ermittelt werden konnten. Es wurden mindestens vier unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Ergebnisse

Tabelle 5.2: EC₅₀- und E_{max}-Werte aus den, in Abbildung 5.6 dargestellten Ca²⁺-Konzentrations-Wirkungskurven

Peptid		hMrgX1	mMrgC	rMrgC
BAM8-22	EC ₅₀ (μM)	0,27 ± 0,03	0,40 ± 0,05	0,85 ± 0,06
	E _{max} (%)	100 ± 5	71 ± 4	55 ± 5
γ ₂ -MSH	EC ₅₀ (μM)	-	0,54 ± 0,1	0,80 ± 0,15
	E _{max} (%)	keine Wirkung	100 ± 16	100 ± 26
Dynorphin-14	EC ₅₀ (μM)	-	0,46 ± 0,06	R ² > 0,8
	E _{max} (%)	keine Wirkung	55 ± 4	7 ± 1
Dynorphin-A	EC ₅₀ (μM)	-	-	-
	E _{max} (%)	keine Wirkung	keine Wirkung	keine Wirkung
NPFF	EC ₅₀ (μM)	-	0,95 ± 0,13	-
	E _{max} (%)	keine Wirkung	24 ± 9	keine Wirkung
NPAF	EC ₅₀ (μM)	-	0,90 ± 0,10	1,15 ± 0,46
	E _{max} (%)	keine Wirkung	35 ± 13	12 ± 9

EC₅₀- (in μM) und E_{max}-Werte (in %) der hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptor-abhängigen Ca²⁺-Mobilisation (vgl. Abbildung 5.6) durch verschiedene Peptide (s. Spalte links) sind dargestellt.

5.1.4 Erk-1/2-Aktivierung durch hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren

Um die beschriebenen pharmakologischen Unterschiede zu erhärten, sollte im Folgenden untersucht werden, ob die bislang untersuchten Liganden neben der Mobilisation von Ca²⁺-Ionen aus dem ER weitere Signaltransduktionskomponenten über hMrgX1/MrgC-Rezeptoren distinkt regulieren können. Die Serin/Threonin-Kinase Erk-1/2 wurde als potentielle Mrg-Rezeptorzielstruktur ausgewählt, da proliferative Prozesse häufig Erk-1/2-vermittelt induziert werden (Meloche, 2007) und Mrg-Rezeptoren eine hohe Homologie zum MAS1-Onkogen aufweisen (Dong, 2001). Bislang ist eine hMrgX1/MrgC-vermittelte Aktivierung der Erk-1/2 allerdings noch nicht beschrieben worden. Die Aktivierung der Erk-1/2 wird durch Phosphorylierung bzw. Dephosphorylierung von Tyrosin 204 bzw. 187 reguliert, so dass in dieser Arbeit unter Einsatz eines Phospho-spezifischen Antikörpers der Aktivierungszustand der Erk-1/2 mittels Immunoblot untersucht werden konnte (vgl. Abschnitt 4.2.3.4). Dafür wurden die hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklone mit den drei potentesten Agonisten aus den Ca²⁺-Mobilisationsversuchen, BAM8-22, γ₂-MSH und Dynorphin-14 oder mit FCS als Positiv-Kontrolle für 5 Minuten stimuliert und lysiert. Das Proteinlysate wurde daraufhin auf die Phosphorylierung der Erk-1/2 hin untersucht. Alle drei untersuchten Mrg-Rezeptoren sind nach Stimulation mit BAM8-22 in der Lage, die Erk-1/2-Phosphorylierung und damit Aktivierung deutlich zu steigern (Abbildung 5.7). Dabei induziert BAM8-22 über den hMrgX1-Rezeptor eine Erk-1/2-Phosphorylierung von 518 ± 127 %, während über den MrgC-Rezeptor der Maus bzw. der Ratte eine Erk-1/2-Phosphorylierung von 241 ± 51 % bzw. 301 ± 40 % vermittelt

Ergebnisse

wird. Somit konnte in dieser Arbeit erstmals ermittelt werden, dass Rezeptoren der Mrg-Familie in der Lage sind, die Serin/Threonin-Kinasen Erk-1/2 zu aktivieren.

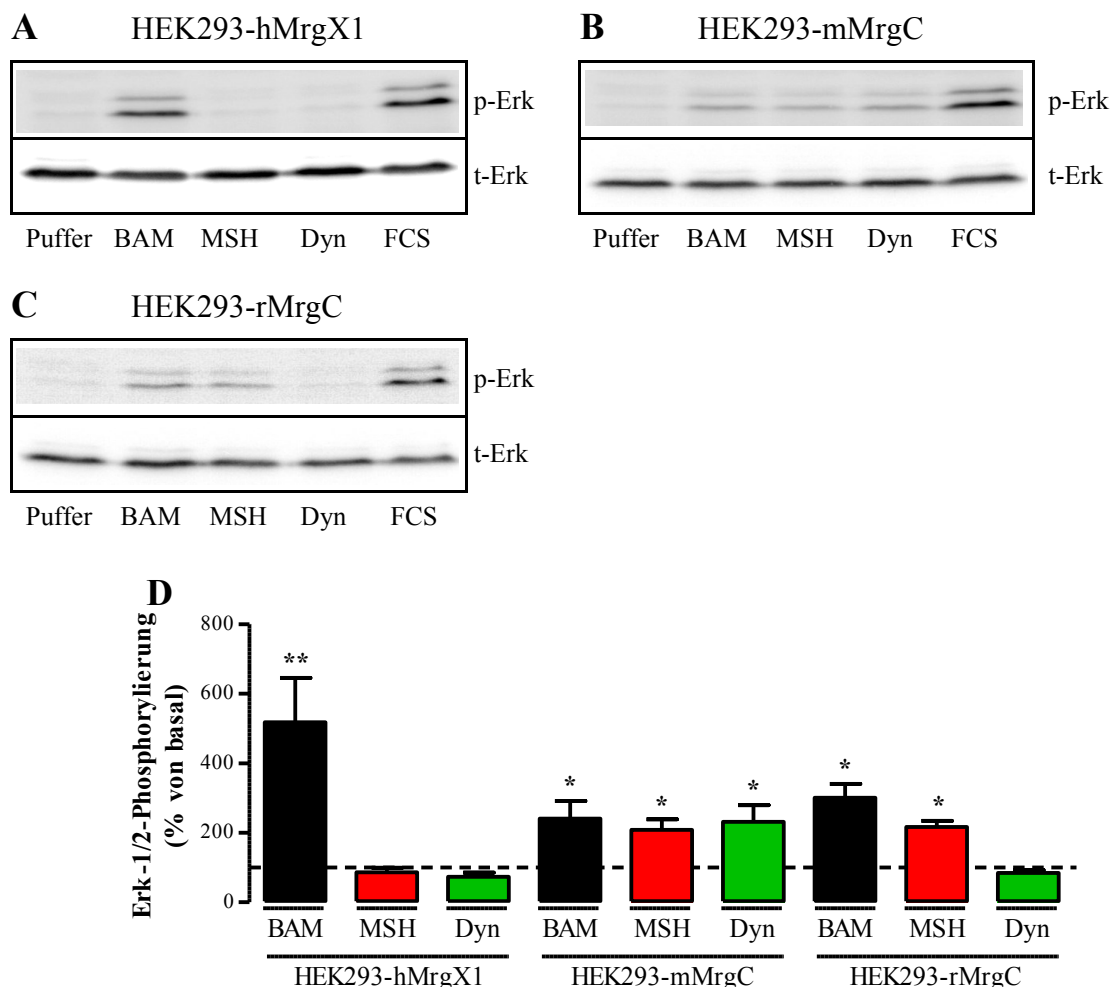


Abbildung 5.7: Erk-1/2-Phosphorylierung in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen

(A - C): HEK293-hMrgX1- (A), HEK293-mMrgC- (B) oder HEK293-rMrgC-Zellen (C) wurden für 5 Minuten mit je 1 μ M BAM8-22 (BAM), γ_2 -MSH (MSH), Dynorphin-14 (Dyn) oder 10 % FCS als Positiv-Kontrolle stimuliert und anschließend lysiert. Die Erk-1/2-Phosphorylierung wurde dann durch Immunoblot mit dem p-Erk-1/2-Antikörper (p-Erk) analysiert. Danach wurde der p-Erk-1/2-Antikörper wieder von der Membran abgelöst und die Membran wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelspuren mit dem Erk-2-Antikörper (t-Erk) inkubiert. (D) Quantifizierung der Erk-1/2-Phosphorylierung. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Schwärzung der p-Erk-1/2-Banden quantifiziert und diese Daten wurden auf die Schwärzung in der Ladekontrolle Erk-2 normiert. Die so quantifizierten Daten wurden anschließend auf den jeweiligen Basalwert (Puffer) bezogen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Außerdem wird deutlich, dass das distinkte pharmakologische Profil der verschiedenen Mrg-Rezeptoren, welches zuvor in Bezug auf die Ca^{2+} -Mobilisation beschrieben wurde (vgl. Abschnitte 5.1.2 und 5.1.3), auf die Erk-1/2-Aktivierung übertragbar ist. Der hMrgX1-Rezeptor phosphoryliert Erk-1/2 nur nach Stimulation mit BAM8-22. BAM8-22 und γ_2 -MSH sind in der Lage über beide MrgC-Rezeptoren zu einer Erk-1/2-Phosphorylierung zu führen und Dynorphin-14 kann dies nur über den

mMrgC-Rezeptor bewerkstelligen. Somit ergeben sich für den hMrgX1-Rezeptor im Vergleich zu den MrgC-Rezeptoren auf zwei verschiedenen Signaltransduktionsebenen in HEK293-Zellen deutliche pharmakologische Unterschiede.

5.1.5 Pharmakologie des hMrgX1-Rezeptors in F11-Zellen

hMrgX1-Rezeptoren weisen ein sehr spezifisches Expressionsmuster auf und wurden als Spinalganglienneuronen-spezifische Proteine beschrieben (Lembo, 2002). Signaltransduktionsprozesse eines Rezeptors können vom jeweiligen zellulären Modell abhängig sein, beispielsweise fehlt die Liganden-induzierte Endozytose von GPCR in COS7-Zellen aufgrund der sehr geringen β -Arrestin-Expression fast vollständig (Menard, 1997, Zhang, 1997). So ist es möglich, dass die Signaltransduktion des hMrgX1-Rezeptors in seiner nativen Umgebung von derer in HEK293-Zellen differiert. Da zurzeit keine humane Spinalganglienneuronen-Zelllinie existiert, wurden in dieser Arbeit F11-Zellen zur Analyse des Ligandenprofils des hMrgX1-Rezeptors eingesetzt. F11-Zellen sind durch Fusion von Spinalganglienneuronen der Ratte und der murinen Neuroblastom-Zelllinie N18TG2 generiert worden (Platika, 1985b) und wurden in der Vergangenheit erfolgreich als Modellsystem für Signaltransduktionsprozesse in primären Spinalganglienneuronen eingesetzt (Eijkelkamp, 2010, Fan, 1993, Fan, 1992, Fioravanti, 2008, Francel, 1987a, Francel, 1987b, Gaudioso, 2012, Jow, 2006, Jung, 2008a, Jung, 2008b, Li, 2004, McIlvain, 2006, Puttfarcken, 1997, Boland, 1991).

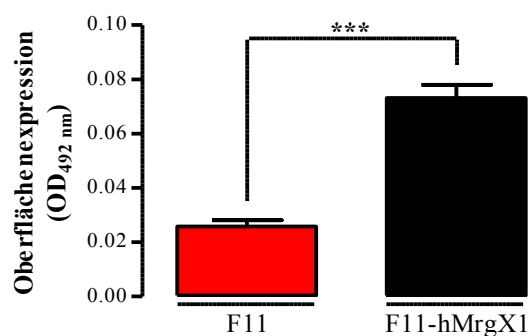


Abbildung 5.8: Oberflächenexpression von Xpress-Epitop-hMrgX1-Fusionsproteinen in F11-hMrgX1-Zellen

Nachweis von Xpress-Epitop-hMrgX1-Fusionsproteinen an der Zelloberfläche mittels ELISA in nicht transfizierten (F11) und hMrgX1-Rezeptor stabil-exprimierenden F11-Zellen. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Ausgehend von diesen parenteralen F11-Zellen wurden den hMrgX1-Rezeptor stabil-exprimierende Zellen generiert, indem der pcDNA4-hMrgX1-Vektor transfiziert und nachfolgend selektioniert wurde. Der Erfolg dieser Selektion wurde zunächst über den Nachweis von Xpress-Epitop-Rezeptor-Fusionsproteinen auf der Zelloberfläche mittels ELISA nachgewiesen (Abbildung 5.8). Es ergab sich eine Zunahme des Antikörper-abhängigen Substratsatzes von $0,047 \pm 0,005$. Im Vergleich mit der

heterologen hMrgX1-Expression in HEK293-hMrgX1-Zellen ist dieser Wert deutlich geringer (vgl. Abbildung 5.1) und deutet damit auf eine moderate heterologe Expression des hMrgX1-Rezeptors hin.

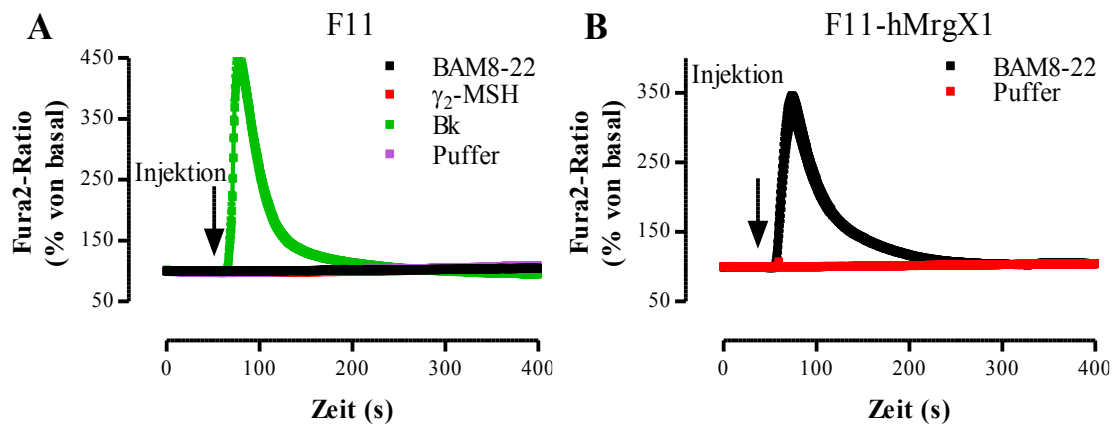


Abbildung 5.9: Ca^{2+} -Mobilisation in F11- und F11-hMrgX1-Zellen

(A - B): Ca^{2+} -Imaging Signale in parenteralen F11- (A) und F11-hMrgX1-Zellen (B) nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von Puffer mit oder ohne BAM8-22, γ_2 -MSH oder Bradykinin (Bk, alle 1 μM). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und dabei mindestens 13 einzelne Zellen gemessen.

Die funktionelle Etablierung der F11-hMrgX1-Zelllinie sollte wiederum durch den Nachweis der BAM8-22-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation erfolgen. Allerdings musste zunächst überprüft werden, ob ein etwaiges Ca^{2+} -Signal auf die hMrgX1-Expression zurückzuführen ist, oder ob eine eventuelle endogene rMrgC-Expression der parenteralen F11-Zelllinie dafür verantwortlich sein könnte. Diese Versuche wurden mittels Imaging auf der Ebene einzelner Zellen durchgeführt (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2), um für spätere Versuche eine Aussage über das hMrgX1-Expressionsniveau einzelner Zellen innerhalb der F11-hMrgX1-Zellpopulation treffen zu können. Zunächst wurden F11-Zellen mit BAM8-22 oder γ_2 -MSH stimuliert. In Abbildung 5.9A ist zu erkennen, dass beide Peptide nicht zu einer Ca^{2+} -Mobilisation führten. Als Positiv-Kontrolle wurde Bradykinin eingesetzt, welches den in F11-Zellen endogen exprimierten B2R aktiviert (Francel, 1987a, Francel, 1987b). Die Stimulation mit Bradykinin löste eine integrierte Ca^{2+} -Mobilisation (AUC in FE x 1000) von $13,5 \pm 0,7$ aus, so dass BAM8-22 und γ_2 -MSH prinzipiell Bedingungen vorgefunden hätten, unter denen die Freisetzung von Ca^{2+} -Ionen aus dem ER möglich war. In F11-hMrgX1-Zellen führte die Stimulation mit BAM8-22 zu einer eindeutigen Ca^{2+} -Mobilisation, wobei mehr als 90 % der Zellen mit einer Erhöhung der Fura2-Ratio um mehr als 25 % reagierten (Abbildung 5.9B). Damit kann davon ausgegangen werden, dass BAM8-22 hMrgX1-vermittelt zu einer Ca^{2+} -Mobilisation in der F11-hMrgX1-Zellpopulation führt. Es ergab sich eine integrierte Ca^{2+} -Mobilisation von $13,9 \pm 1,0$. Dieser Wert ist in guter Übereinstimmung mit der Bradykinin-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation in F11-Zellen, deutet auf ein moderates Expressionsniveau des hMrgX1-Rezeptors in F11-hMrgX1-Zellen hin und unterstützt

Ergebnisse

damit den Befund aus Abbildung 5.8. Außerdem scheint die F11-hMrgX1-Zellpopulation in Bezug auf die funktionale hMrgX1-Expression sehr homogen zu sein.

Nach der Etablierung dieses hMrgX1-Rezeptor stabil-exprimierenden, Spinalganglienneuronen-ähnlichen Zellmodells konnte nun der Frage nachgegangen werden, ob die pharmakologischen Unterschiede zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren dem HEK293-Zellmodell geschuldet waren, oder ob diese Unterschiede Rezeptor-intrinsische Eigenschaften darstellen. Dazu wurden Fura2-AM-beladene F11-hMrgX1-Zellen mit BAM8-22, γ_2 -MSH, Dynorphin-14, Dynorphin-A, NPFf und NPAF stimuliert. Auch in F11-hMrgX1-Zellen ergab sich eine BAM8-22-selektiven Ca^{2+} -Mobilisation (Abbildung 5.10), da nur die Injektion von BAM8-22 zu einer deutlichen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration führte. Damit wurde das Bild, das in HEK293-hMrgX1-Zellen generiert wurde, komplett bestätigt, so dass bei den ermittelten pharmakologischen Unterschieden zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren von Rezeptor-intrinsischen Eigenschaften ausgegangen werden kann.

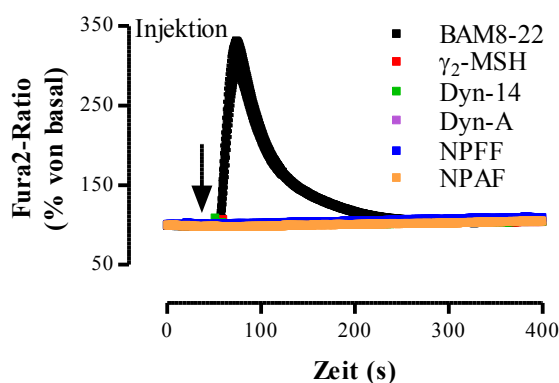


Abbildung 5.10: BAM8-22-selektive Ca^{2+} -Mobilisation in F11-hMrgX1-Zellen

Ca^{2+} -Imaging Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von BAM8-22, γ_2 -MSH, Dynorphin-14 (Dyn-14), Dynorphin-A (Dyn-A), NPFf oder NPAF (alle 2 μM). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und dabei mindestens 42 einzelne Zellen gemessen.

Zum Abschluss der pharmakologischen Charakterisierung des hMrgX1-Rezeptors in F11-hMrgX1-Zellen sollte untersucht werden, ob mMrgC-Rezeptor-spezifischen Agonisten möglicherweise nur die intrinsische Effizienz, den hMrgX1-Rezeptor zu aktivieren, fehlt, sie aber zu einer hoch-affinen Bindung an den hMrgX1-Rezeptor in der Lage sind. Eine solche Bindung sollte diejenige von BAM8-22 an den hMrgX1-Rezeptor und somit die nachfolgende Rezeptoraktivierung blockieren. Während der Messung der BAM8-22-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation in F11-hMrgX1-Zellen wurde Puffer oder Puffer mit γ_2 -MSH, Dynorphin-14 oder NPFf injiziert, bevor etwa 3 Minuten später mit BAM8-22 stimuliert wurde. Es zeigte sich, dass weder γ_2 -MSH noch Dynorphin-14 oder NPFf in der Lage sind, BAM8-22 die Fähigkeit zu nehmen, den hMrgX1-Rezeptor zu aktivieren (Abbildung 5.11). Die BAM8-22-vermittelte integrierte Ca^{2+} -Mobilisation betrug nach Inkubation mit Puffer oder γ_2 -MSH $10,0 \pm 1,2$ bzw. $8,6 \pm 1,2$ (Abbildung 5.11A), nach Inkubation mit Puffer oder Dynorphin-14 $12,6 \pm 0,5$ bzw. $11,6 \pm 0,3$

Ergebnisse

(Abbildung 5.11B) und nach Inkubation mit Puffer oder NPFF $9,6 \pm 0,4$ bzw. $9,1 \pm 0,4$ (Abbildung 5.11D). In keinem Fall differierten die Liganden-induzierten Werte signifikant von der Pufferkontrolle, womit davon ausgegangen werden kann, dass die BAM8-22-selektive Signaltransduktion des hMrgX1-Rezeptors sowie die deutlichen pharmakologischen Unterschiede im Vergleich mit den MrgC-Rezeptoren nicht aus einer fehlenden intrinsischen Effizienz mMrgC-spezifischer Liganden resultieren, sondern im Fehlen einer hoch-affinen Bindungsstelle des hMrgX1-Rezeptor für diese Peptide begründet liegt.

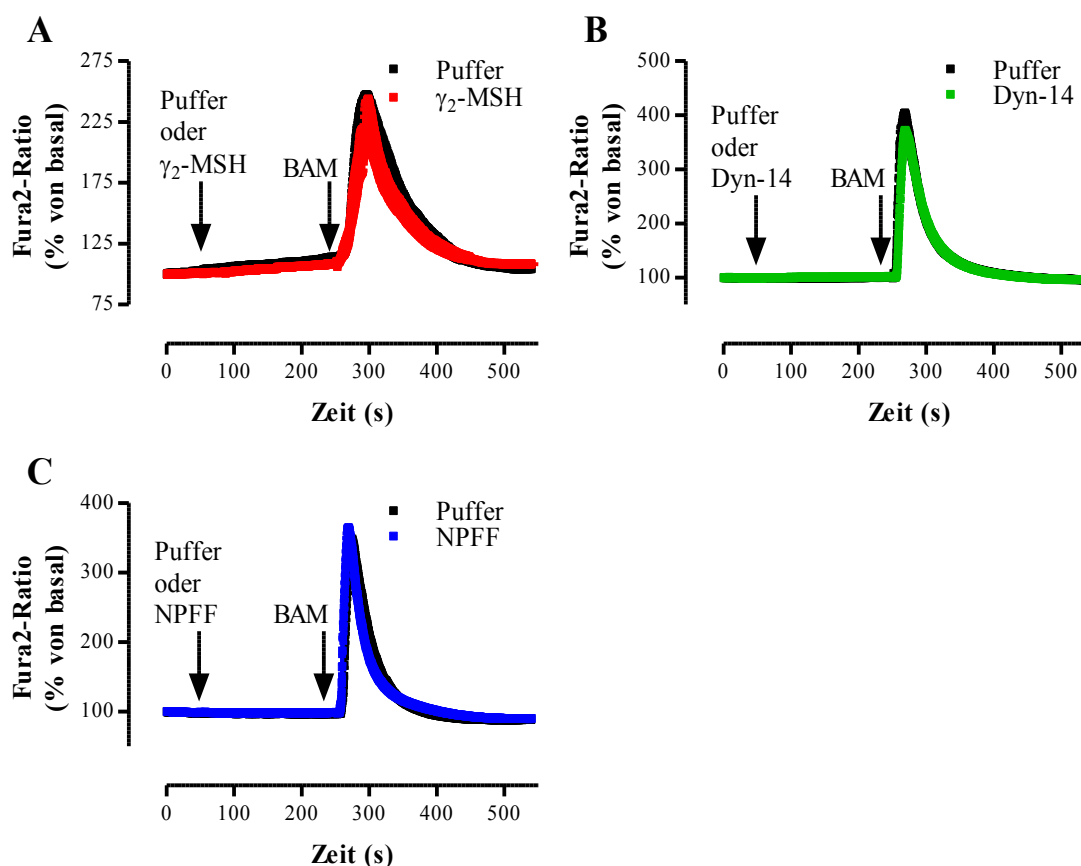


Abbildung 5.11: BAM8-22-induzierte Ca^{2+} -Mobilisation in F11-hMrgX1-Zellen in Anwesenheit MrgC-spezifischer Liganden

(A - C) Ca^{2+} -Imaging Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von BAM8-22 (BAM, 1 μM) nach vorheriger Injektion einer Pufferlösung mit oder ohne γ_2 -MSH (A), Dynorphin-14 (Dyn-14, B) oder NPFF (alle 2 μM , C). Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und dabei mindestens 44 einzelne Zellen gemessen.

Da im Rahmen dieser Arbeit nur die Generierung einer hMrgX1-Rezeptor stabil-exprimierenden F11-Zelllinie gelungen ist, wurde nach transienter Expression von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren mittels γ_2 -MSH zusätzlich zu BAM8-22 exemplarisch überprüft, ob in F11-Zellen überhaupt Ca^{2+} -Signale MrgC-spezifischer Liganden zu messen sind. Dabei zeigte sich das schon bekannte Bild der BAM8-22-selektiven Ca^{2+} -Mobilisation durch den hMrgX1-Rezeptor (Abbildung 5.12A) bzw. der äquipotenten und äquieffizienten Aktivierung des mMrgC-Rezeptors durch beide Liganden (Abbildung

5.12B). Für den rMrgC-Rezeptor ist auch nach transients Expression in F11-Zellen das schon aus HEK293-rMrgC-Zellen bekannte pharmakologische Bild einer BAM8-22- und γ_2 -MSH-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation ersichtlich (Abbildung 5.12C). Dabei zeichnete sich γ_2 -MSH durch eine höhere Potenz aus, da 5-fach höhere BAM8-22-Konzentrationen nötig waren, um ein gleichförmiges Ca^{2+} -Signal zu induzieren. Somit konnten die pharmakologischen Ergebnisse aus HEK293-Zellen für alle drei Mrg-Rezeptoren nach transients Expression in F11-Zellen bestätigt werden und es wird deutlich, dass γ_2 -MSH über MrgC-Rezeptoren auch in F11-Zellen Ca^{2+} -Signale auslösen kann.

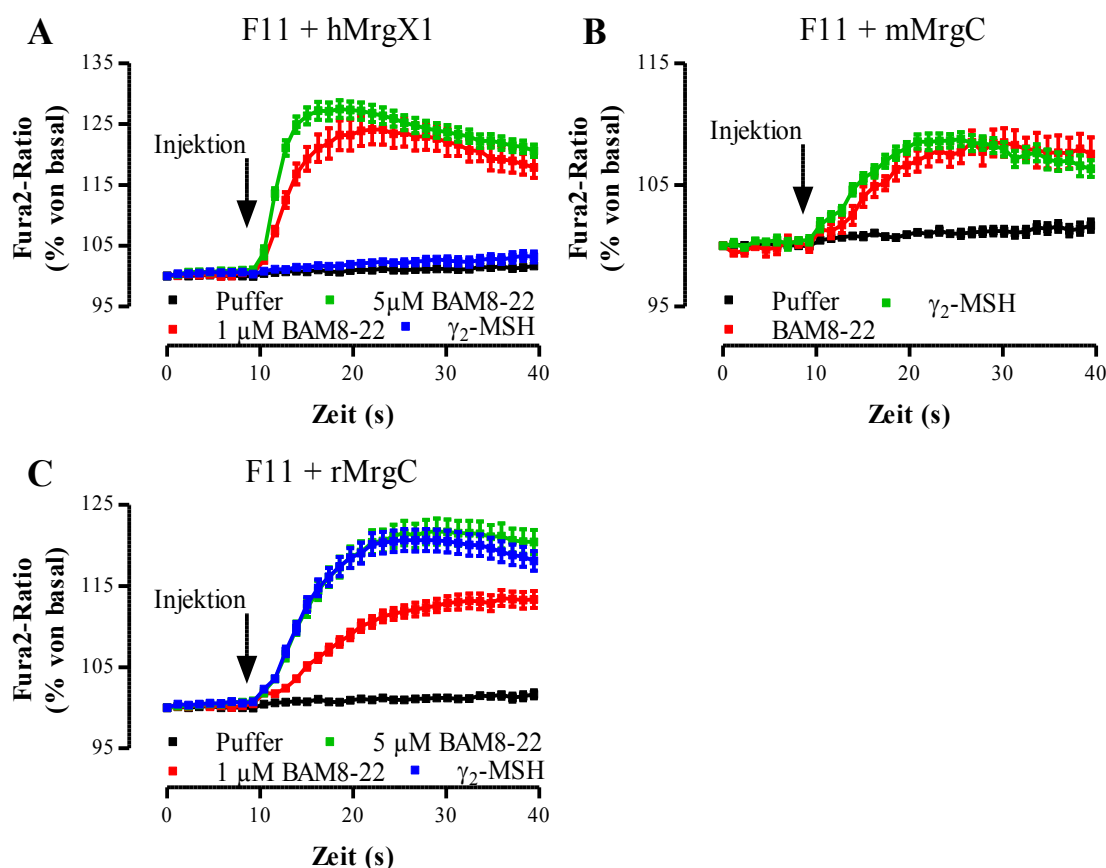


Abbildung 5.12: Liganden-induzierte Ca^{2+} -Mobilisation in F11-Zellen nach transients Expression von hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren

(A - C) Ca^{2+} -Signale in F11-Zellen nach transients Expression des hMrgX1- (A), mMrgC- (B) oder rMrgC-Rezeptors (C). Die Zellen wurden mit Fura2-AM beladen und Puffer, BAM8-22 (1 µM oder wie angegeben) oder γ_2 -MSH (1 µM) wurden nach 10 Sekunden injiziert. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Zusammenfassend liefert diese Arbeit zum ersten Mal vergleichende pharmakologische Daten für den hMrgX1-Rezeptor und die MrgC-Rezeptoren aus Maus und Ratte, welche von verschiedenen Arbeitsgruppen als Modellsystem für den hMrgX1-Rezeptor genutzt wurden. Es zeigen sich deutliche Unterschiede im Ligandenprofil der drei Rezeptoren, die nur durch die fehlende hoch-affine Bindung von MrgC-spezifischen Liganden an den hMrgX1-Rezeptor erklärbar sind. Damit kann von unterschiedlich geformten Ligandenbindungsdomänen ausgegangen werden, was die Validität von MrgC-Rezeptoren als Modellsystem für den hMrgX1-Rezeptor zumindest in Frage stellt.

5.2 Regulation von hMrgX1/MrgC-Rezeptoren durch permanente Ligandenstimulation

5.2.1 Spezies-spezifische Desensitisierung der Ca²⁺-Signale von Mrg-Rezeptoren

Viele GPCR zeigen das Phänomen der Desensitisierung von ihnen aktivierter Signalwege nach andauernder Stimulation mit ihrem Agonisten (Ferguson, 2001). Die Desensitisierung beschreibt dabei einen negativen Rückkopplungsmechanismus, der in einer Abnahme der Signalstärke resultiert (vgl. Abschnitt 3.1.7). Dieses Phänomen ist beispielsweise einer der mechanistischen Gründe für die Toleranz gegenüber Opioiden und somit ein klinisch ernst zu nehmendes Problem in der Medizin (Berger, 2010). Daher ist die Analyse der Regulation eines GPCR durch andauernde Stimulation mit einem Agonisten ein grundlegender Teil der pharmakologischen Grundlagenforschung und im Zuge einer Wirkstoffentwicklung unerlässlich. Bislang ist die Regulation von hMrgX1-Rezeptoren allerdings nicht untersucht worden.

Aufgrund ihrer technisch robusten Messbarkeit ist die Rezeptor-vermittelte Ca²⁺-Mobilisation gut geeignet, um erste Hinweise auf eine mögliche Liganden-induzierte Desensitisierung von hMrgX1- oder mMrgC-Rezeptoren zu erhalten. Daher wurden HEK293-hMrgX1- oder -mMrgC-Zellen für 30 Minuten mit einer maximal aktivierenden Konzentration BAM8-22 (vgl. Abbildung 5.4) oder nur mit Puffer inkubiert. Danach wurde der Agonist von den Zellen gewaschen und die Fähigkeit von BAM8-22 untersucht, Ca²⁺-Signale auszulösen. In Abbildung 5.13A ist zu erkennen, dass die Vorstimulation mit BAM8-22 die Ca²⁺-Mobilisation des mMrgC-Rezeptors deutlich verringert, bezogen auf die gesamte Ca²⁺-Mobilisation (AUC) um 58 %. Interessanterweise verhält sich der hMrgX1-Rezeptor völlig anders, da nach der neuerlichen Stimulation mit BAM8-22 nicht unterschieden werden kann, ob die jeweilige Zellpopulation vorstimuliert wurde oder nicht (Abbildung 5.13B). Die vorliegende Desensitisierung des mMrgC-Rezeptors könnte auch durch eine Desensitisierung der gesamten zellulären Ca²⁺-Mobilisationsmaschinerie erklärt werden. Ein solcher Fall sollte sich dann auch heterolog auf die Ca²⁺-Mobilisation anderer G_{q/11}-koppelnder GPCR auswirken. Daher wurde in HEK293-mMrgC-Zellen nach Vorstimulation mit BAM8-22 ebenso die Ca²⁺-Mobilisation des endogen exprimierten, M3-Acetylcholinrezeptors durch Stimulation mit seinem Agonisten Carbachol (CCH) untersucht (Luo, 2008). In Abbildung 5.13C ist zu erkennen, dass die BAM8-22-Vorstimulation von HEK293-mMrgC-Zellen keinen Einfluss auf die CCH-vermittelte Ca²⁺-Mobilisation hatte, so dass von einem spezifischen mMrgC-Rezeptor desensitisierenden Effekt der BAM8-22-Vorstimulation ausgegangen werden kann.

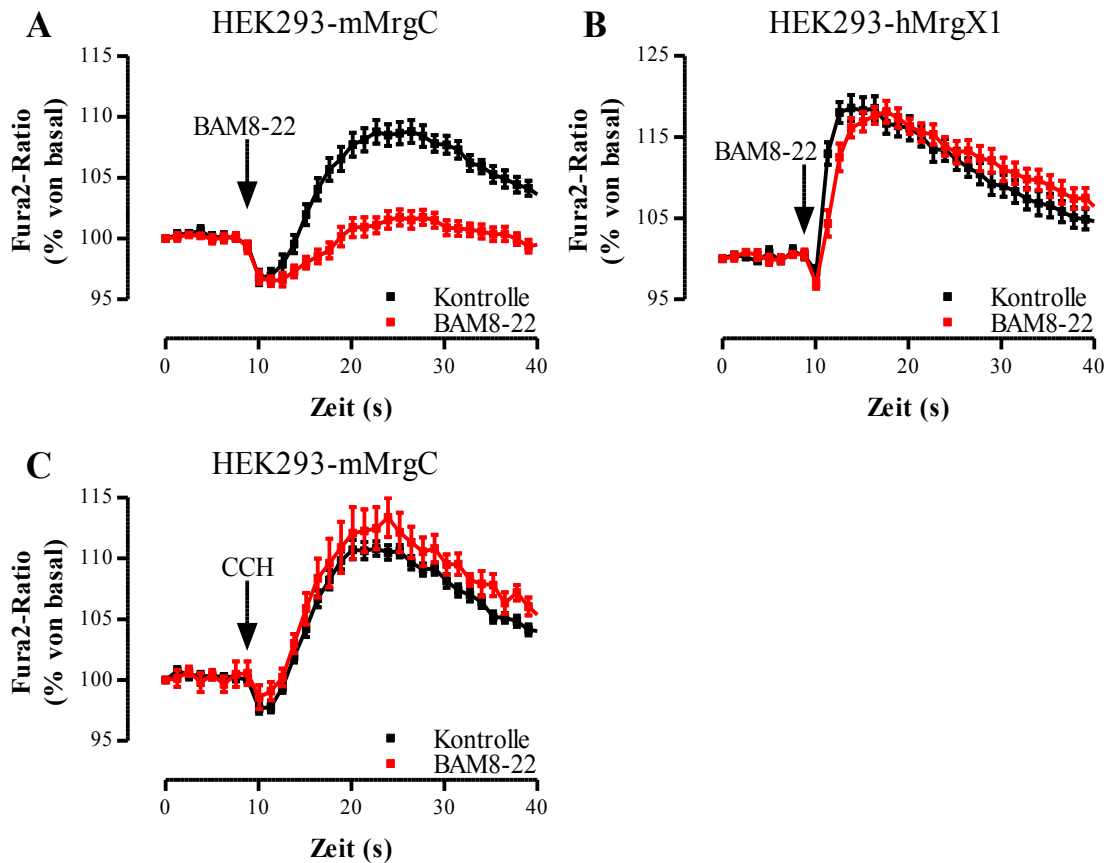


Abbildung 5.13: Ca^{2+} -Signale in HEK293-hMrgX1- und -mMrgC-Zellen nach Vorstimulation mit BAM8-22

(A - C): Ca^{2+} -Signale in HEK293-mMrgC- (A und C) und HEK293-hMrgX1-Zellen (B) nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von BAM8-22 (1 μM) oder CCH (100 μM). Die Zellen wurden vor der Messung für 30 Minuten mit 1 μM BAM8-22 vorstimuliert (rot) oder nur mit Puffer inkubiert (schwarz). Es wurden drei (HEK-hMrgX1) bzw. sechs (HEK293-mMrgC) unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

5.2.2 Spezies-spezifische Liganden-induzierte Endozytose von Mrg-Rezeptoren in HEK293-Zellen

5.2.2.1 Liganden-induzierte Endozytose in Mrg-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellen

Im Folgenden sollte der Anfangsbefund einer Spezies-spezifischen Desensibilisierung innerhalb der BAM-sensitiven Mrg-Rezeptoren bestätigt und ein molekularer Grund für diesen Unterschied geliefert werden. Ein naheliegender Prozess, der zur Desensibilisierung von Rezeptor-vermittelten Signalwegen beiträgt (vgl. Abschnitt 3.1.7.3), ist die Liganden-abhängige Rezeptorendozytose (Ferguson, 2001). Zur Detektion der Liganden-induzierten Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren macht man sich in einem ELISA mit intakten Zellen experimentell zu Nutze, dass Antikörper die Zellmembran nicht permeieren und somit nur Rezeptoren an der Oberfläche der Zelle detektiert werden (vgl. Abschnitt 4.2.3.1). Werden Zellen mit sättigenden Ligandenkonzentrationen stimuliert, nimmt das detektierte Signal bei abgelaufener Rezeptorendozytose ab, während es bei fehlender Endozytose unverändert bleibt.

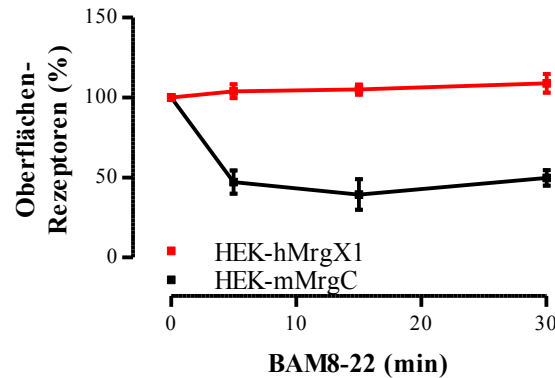


Abbildung 5.14: BAM8-22-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in HEK293-mMrgC- und -hMrgX1-Zellen

Rezeptorendozytose in HEK293-mMrgC- (schwarz) und HEK293-hMrgX1-Zellen (rot) nach Stimulation für 5, 15 oder 30 Minuten mit BAM8-22 (1 μ M). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen (hier Zeitpunkt 0 min) zur Normierung mitgeführt. Die Rezeptorexpression an der Zelloberfläche ist gegen die Stimulationszeit aufgetragen. Es wurden drei (HEK-hMrgX1) bzw. sechs (HEK-mMrgC) unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Zunächst wurden HEK293-mMrgC- oder HEK293-hMrgX1-Zellen für 5, 15 oder 30 Minuten mit BAM8-22 stimuliert, um danach die Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren zu analysieren. In Abbildung 5.14 ist zu erkennen, dass die Stimulation in HEK293-mMrgC-Zellen zu einer deutlichen Abnahme der Oberflächenexpression des mMrgC-Rezeptors führte. So betrug die Menge an Oberflächen-Rezeptoren nach 30 Minuten Stimulationszeit beispielsweise nur noch 50 ± 5 % der Ausgangsmenge. Dieser Befund ist als signifikante Endozytose des mMrgC-Rezeptors anzusehen, während in HEK293-hMrgX1-Zellen der hMrgX1-Rezeptor über die gesamte Stimulationszeit resistent gegenüber diesem Regulationsmechanismus war. Die, in Abschnitt 5.2.1 ermittelte, Spezies-spezifische Desensibilisierung der Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation kann also durchaus auf eine Spezies-spezifische Endozytose innerhalb der BAM8-22-sensitiven Mrg-Rezeptoren zurückzuführen sein.

Sodann wurde überprüft, ob die BAM8-22-vermittelte mMrgC-Endozytose ein BAM8-22-spezifisches Phänomen darstellt oder ob andere Liganden auch zu einer Rezeptorendozytose führen (Abbildung 5.15A). Es zeigte sich, dass eine 30-minütige Stimulation sowohl mit γ_2 -MSH als auch mit Dynorphin-14 zu einer Endozytose von 39 ± 8 % bzw. 44 ± 7 % führt. Dieses Ausmaß der mMrgC-Endozytose stimmt mit dem BAM8-22-induzierten Effekt (48 ± 5 %) gut überein. Die Effizienz des partiellen Agonisten auf dem Ca^{2+} -Mobilisationsweg, NPFF, reichte jedoch nicht aus, um zur Rezeptorendozytose zu führen (1 ± 4 %).

Es ist denkbar, dass die Ca^{2+} -Mobilisation durch den hMrgX1-Rezeptor nach Stimulation mit BAM8-22 deutlich potenter induziert wird, als eine Rezeptorendozytose, so dass HEK293-hMrgX1-Zellen auch mit einer 5-fach erhöhten BAM8-22-Konzentration stimuliert wurden (Abbildung 5.15B). Es zeigte sich, dass trotz dieser Erhöhung der BAM8-22-Konzentration keine Endozytose des hMrgX1-Rezeptors induziert werden konnte. Zugleich hatte eine Stimulation mit γ_2 -MSH oder Dynorphin-14

auch keinen Effekt auf die Oberflächenexpression des hMrgX1-Rezeptors. Dies ist mit den bisher präsentierten Daten in gutem Einklang, da zum einen die Fähigkeit eines mMrgC-Liganden, Rezeptorendozytose zu induzieren, mit seiner Potenz auf dem Ca^{2+} -Mobilisationsweg korrelierte (vgl. Abschnitt 5.1.2). Zum anderen konnte bereits in Abschnitt 5.1.5 gezeigt werden, dass γ_2 -MSH oder Dynorphin-14 nicht zu einer hoch-affinen Bindung an den hMrgX1-Rezeptor in der Lage sind und somit auch keine Endozytose des hMrgX1-Rezeptors auslösen können.

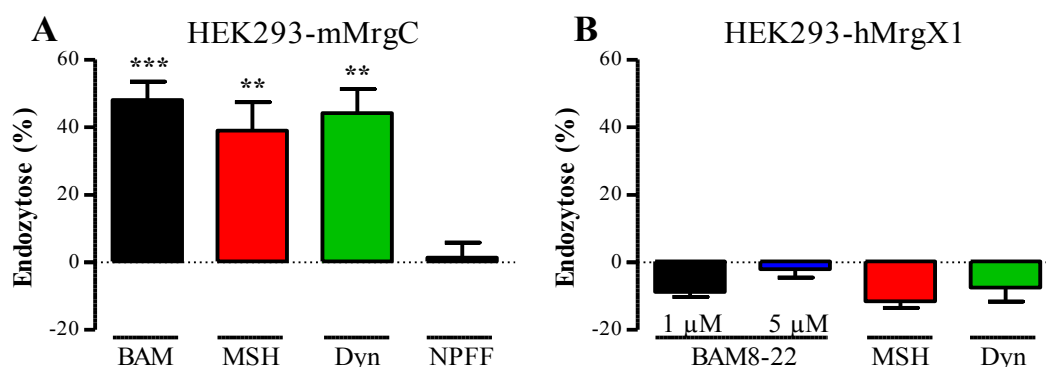


Abbildung 5.15: Liganden-induzierte Rezeptorendozytose in HEK293-mMrgC- und -hMrgX1-Zellen
(A und B) Rezeptorendozytose in HEK293-mMrgC- (A) und HEK293-hMrgX1 Zellen (B) nach 30-minütiger Stimulation mit BAM8-22 (1 μM oder wie angegeben), γ_2 -MSH (MSH), Dynorphin-14 (Dyn) oder NPFF (alle 1 μM). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen. Es wurden mindestens fünf unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

5.2.2.2 Liganden-induzierte Endozytose in Mrg-Rezeptor transient-exprimierenden HEK293-Zellen

Dieser erste Befund einer Spezies-spezifischen Liganden-vermittelten Rezeptorendozytose innerhalb der BAM8-22-sensitiven Mrg-Rezeptoren ist eine gute molekulare Erklärung für die differentielle Desensibilisierung der Ca^{2+} -Signale, die in Abschnitt 5.2.1 beschrieben wurde. Allerdings ist darauf hinzuweisen, dass die basale Oberflächenexpression des hMrgX1-Rezeptors in HEK293-hMrgX1-Zellen die des mMrgC-Rezeptors in HEK293-mMrgC-Zellen um das etwa 2-fache übersteigt (vgl. Abbildung 5.1). Prinzipiell kann ein höheres Expressionsniveau eines GPCR in einem ungünstigen Verhältnis von Rezeptor zu Endozytosemaschinerie resultieren und damit die Fähigkeit zur Endozytose maskieren (Breit, 2006b). Aus transienten Rezeptorexpressionen resultieren häufig unterschiedlich hohe Expressionsniveaus, so dass diese Art der Rezeptorexpression genutzt werden kann, um eventuelle Effekte des Expressionsniveaus auf die Endozytosefähigkeit auszuschließen.

Daher wurden HEK293-Zellen mit pcDNA4-hMrgX1- oder -mMrgC-Vektor transfiziert und analog zu den Experimenten in Abschnitt 5.2.2.1 für 30 Minuten mit MrgC/hMrgX1-Liganden stimuliert. Sodann wurde die Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren analysiert und gegen die basale Oberflächenexpression aufgetragen (Abbildung 5.16A und B). Dabei wird zum einen deutlich, dass die basale

Oberflächenexpression für den mMrgC-Rezeptor zwischen Absorptionswerten von 0,03 und 0,25 und für den hMrgX1-Rezeptor zwischen 0,05 und 0,18 liegt und somit keinen signifikanten Unterschied in der basalen Expression zwischen beiden Rezeptoren besteht. Zum anderen ist zu erkennen, dass trotz des Angleichens der Expressionsniveaus weiterhin eine Spezies-spezifische Rezeptorendozytose ausgelöst wurde. Während der mMrgC-Rezeptor durch BAM8-22 (16 ± 5 %) oder γ_2 -MSH (10 ± 2 %) immer noch endozytiert wird, zeigt sich der hMrgX1-Rezeptor resistent gegenüber einer Endozytose nach Stimulation mit BAM8-22. Zusätzlich zu BAM8-22 konnte in diesen Versuchen auch unter Nutzung des langen BAM-Peptids BAM1-22 keine Endozytose des hMrgX1-Rezeptors ausgelöst werden (Abbildung 5.16B und C). Damit konnte die in HEK293-mMrgC- bzw. -hMrgX1-Zellen ermittelte Liganden-vermittelte Rezeptorendozytose bestätigt werden und es ist davon auszugehen, dass die beobachteten Unterschiede nicht aus technisch begründeten Artefakten resultieren.

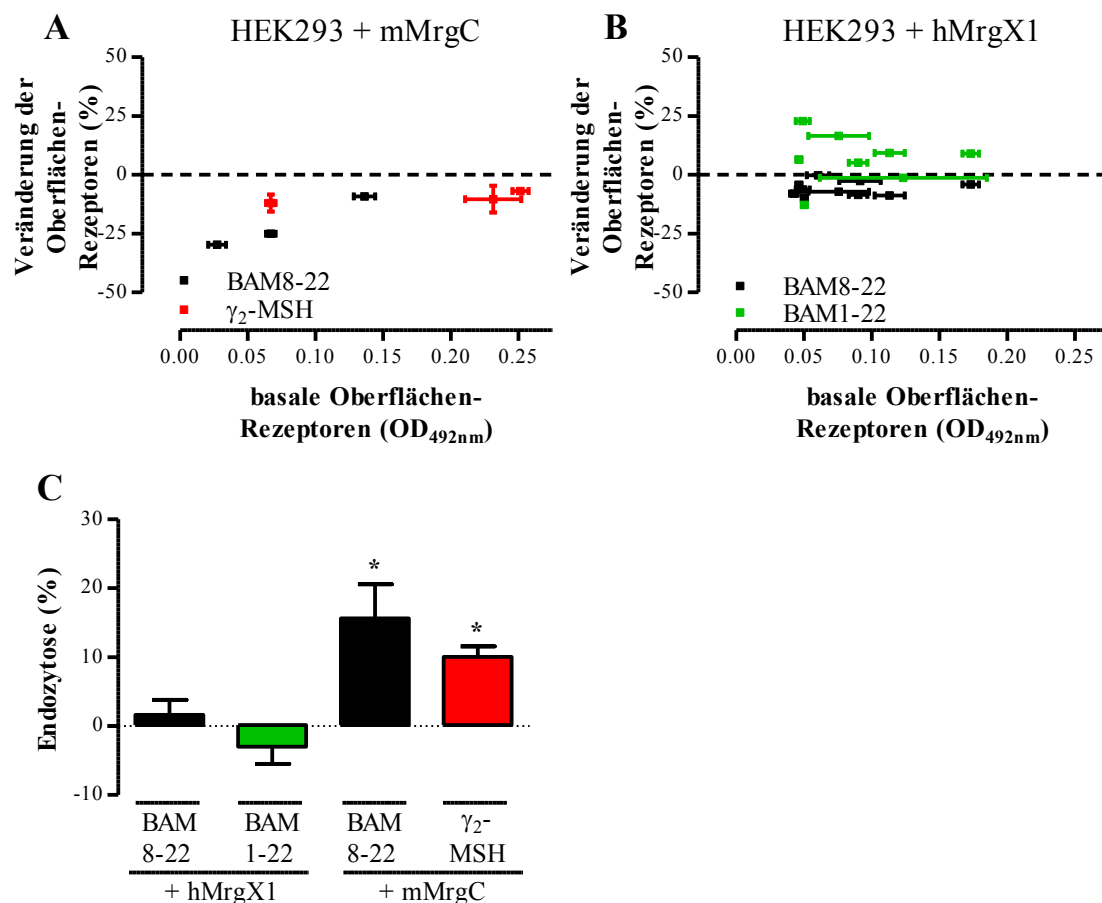


Abbildung 5.16: Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in HEK293-Zellen nach transienter Expression von mMrgC- oder hMrgX1-Rezeptoren

(A und B) Rezeptorendozytose in HEK293-Zellen nach transienter Expression des mMrgC- (A) oder hMrgX1-Rezeptors (B) und 30-minütiger Stimulation mit BAM8-22, γ_2 -MSH oder BAM1-22 (alle 1 μ M). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Experiment, durchgeführt in Quadruplikaten. (C) Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen.

5.2.2.3 Liganden-induzierte Endozytose des rMrgC-Rezeptors in HEK293-rMrgC-Zellen

An diesem Punkt wurde nun auch die Liganden-induzierte Endozytose des rMrgC-Rezeptors in HEK293-rMrgC-Zellen untersucht, um die Endozytoseeigenschaften des mMrgC-Rezeptors vergleichend einschätzen zu können. Dafür wurden HEK293-rMrgC-Zellen für 30 Minuten mit BAM8-22, γ_2 -MSH, Dynorphin-14 oder NPFF stimuliert und nachfolgend wurde die Veränderung der Oberflächenexpression des rMrgC-Rezeptors analysiert. In Abbildung 5.17 ist zu sehen, dass in HEK293-rMrgC-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 ($31 \pm 6 \%$) und γ_2 -MSH ($32 \pm 3 \%$) eine signifikante Endozytose des rMrgC-Rezeptor beobachtet werden kann. Damit scheint die Regulation der MrgC-Rezeptoren durch anhaltende Ligandenstimulation übereinzustimmen, so dass die MrgC-Subfamilie, im Unterschied zum hMrgX1-Rezeptor, in die große Gruppe der endozytierenden Rezeptoren sortiert werden kann. Nach Stimulation mit Dynorphin-14 und NPFF konnte jedoch keine rMrgC-Endozytose induziert werden. Dies stimmt jedoch mit den in Abschnitt 5.1 vorgestellten pharmakologischen Daten überein, nach denen diese beiden Peptide den rMrgC-Rezeptor nicht aktivieren können.

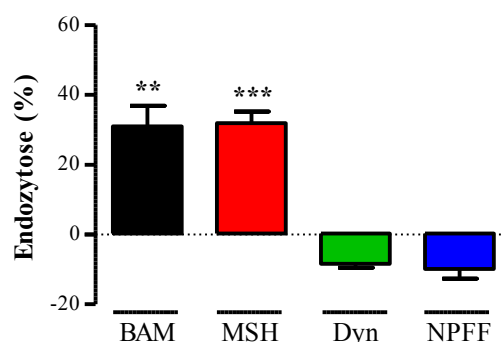


Abbildung 5.17: Liganden-induzierte Rezeptorendozytose in HEK293-rMrgC-Zellen

Rezeptorendozytose in HEK293-rMrgC-Zellen nach 30-minütiger Stimulation mit BAM8-22 (BAM), γ_2 -MSH (MSH), Dynorphin-14 (Dyn) oder NPFF (alle 1 μ M). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen. Es wurden fünf unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

5.2.3 Spezies-spezifische Liganden-induzierte Endozytose von Mrg-Rezeptoren F11-Zellen

Neben der Abhängigkeit vom basalen Expressionsniveau kann das Endozytoseverhalten eines GPCR vom jeweiligen Zellsystem abhängig sein. Dies könnte beispielsweise in einer geringen Expression eines akzessorischen Proteins, das an der Rezeptorendozytose mitwirkt, begründet liegen. Ein Beispiel dafür ist die deutlich reduzierte Liganden-vermittelten Endozytose des β_2 -Adrenorezeptors in COS7-Zellen, in denen geringste Mengen an β -Arrestinen exprimiert werden (Menard, 1997, Zhang, 1997).

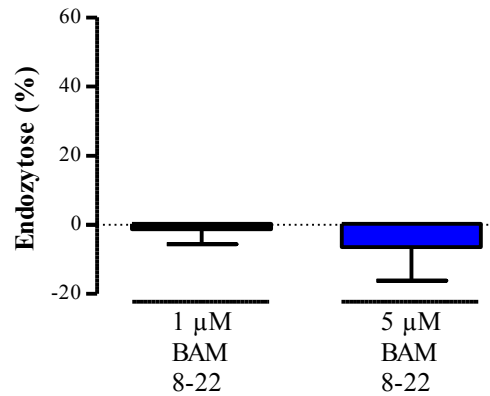


Abbildung 5.18: BAM8-22-induzierte Rezeptorendozytose in F11-hMrgX1-Zellen

Rezeptorendozytose in F11-hMrgX1-Zellen nach 30-minütiger Stimulation mit BAM8-22 (Konzentration wie angegeben). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Daher sollte in den, in Abschnitt 5.1.5 beschriebenen, Spinalganglienneuronen-ähnlichen F11-hMrgX1-Zellen untersucht werden, ob die Resistenz des hMrgX1-Rezeptors gegenüber einer BAM8-22-induzierten Endozytose von HEK293-Zellen übertragbar ist. Dafür wurden F11-hMrgX1-Zellen für 30 Minuten mit verschiedenen Konzentrationen BAM8-22 stimuliert und die Veränderung der Oberflächenexpression des hMrgX1-Rezeptors analysiert. In Abbildung 5.18 ist zu erkennen, dass durch die Stimulation mit verschiedenen Konzentrationen BAM8-22 keine hMrgX1-Endozytose induziert wurde, so dass in F11-hMrgX1-Zellen das bisherige Ergebnis aus HEK293-hMrgX1-Zellen und aus HEK293-Zellen, die transient den hMrgX1-Rezeptor exprimierten, bestätigt werden konnte.

Ergebnisse

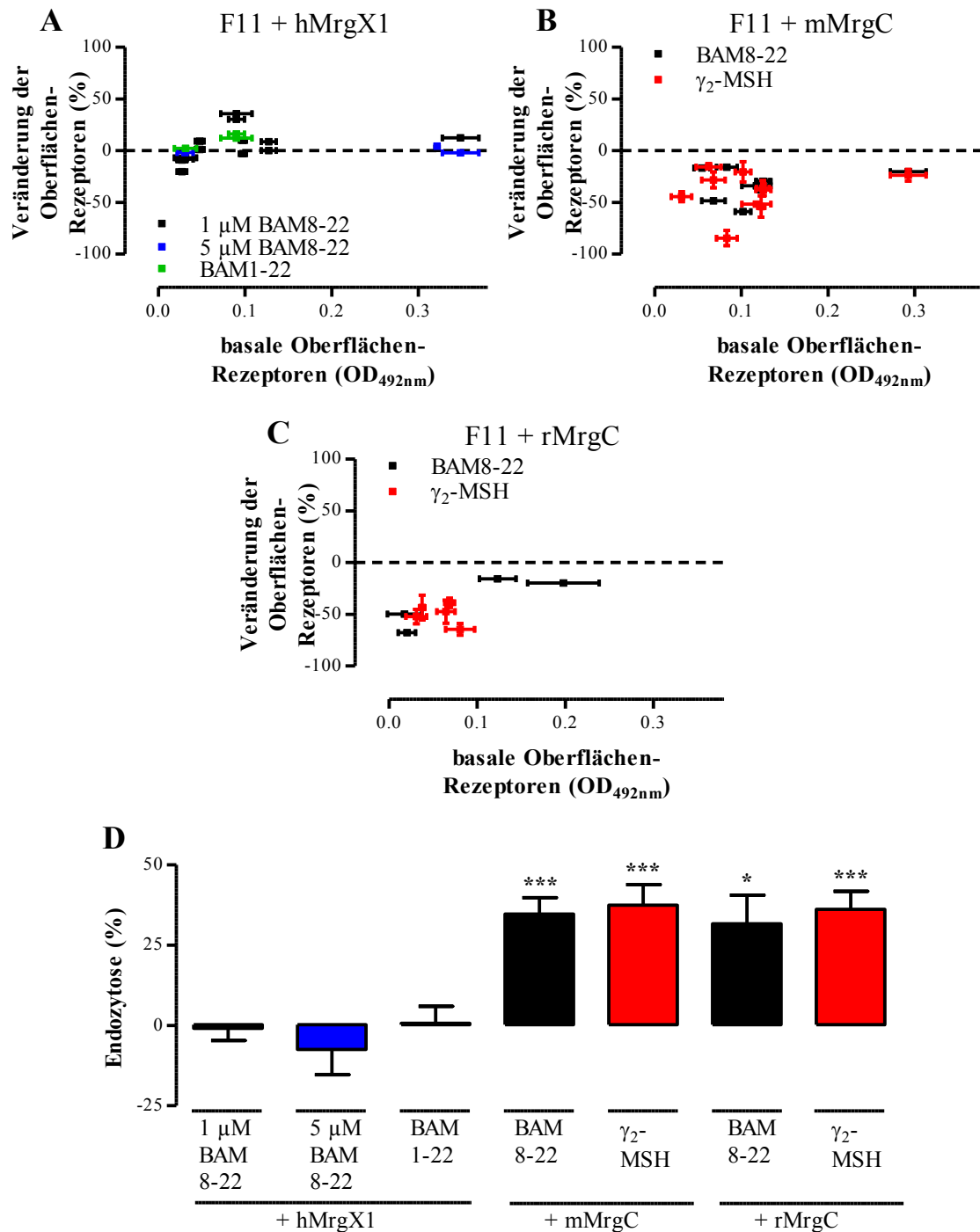


Abbildung 5.19: Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in F11-Zellen nach transienter Expression von hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren

(A bis C) Rezeptorendozytose in F11-Zellen nach transienter Expression des hMrgX1- (A), mMrgC- (B) oder rMrgC-Rezeptors (C) und 30-minütiger Stimulation mit BAM8-22 ((A): wie angegeben, (B): 1 μ M, (C): 5 μ M), γ_2 -MSH oder BAM1-22 (beide 1 μ M). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Experiment, durchgeführt in Quadruplikaten. (D) Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen.

5.2.4 Spezies-spezifische Liganden-induzierte Endozytose von Mrg-Rezeptoren in ND-C-Zellen

Nachdem sich sowohl in HEK293- als auch in F11-Zellen nach transients oder stabiler Rezeptorexpression Spezies-spezifische Unterschiede in der Liganden-vermittelten Endozytose zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren gezeigt haben, sollte dieser Befund in einem zusätzlichen Spinalganglienneuronen-ähnlichen Zellsystem weiter erhärtet werden. Dafür wurden im Rahmen dieser Arbeit ND-C-Zellen genutzt, die durch Fusion einer Neuroblastom-Zelllinie mit Spinalganglienneuronen generiert wurden (Wood, 1990).

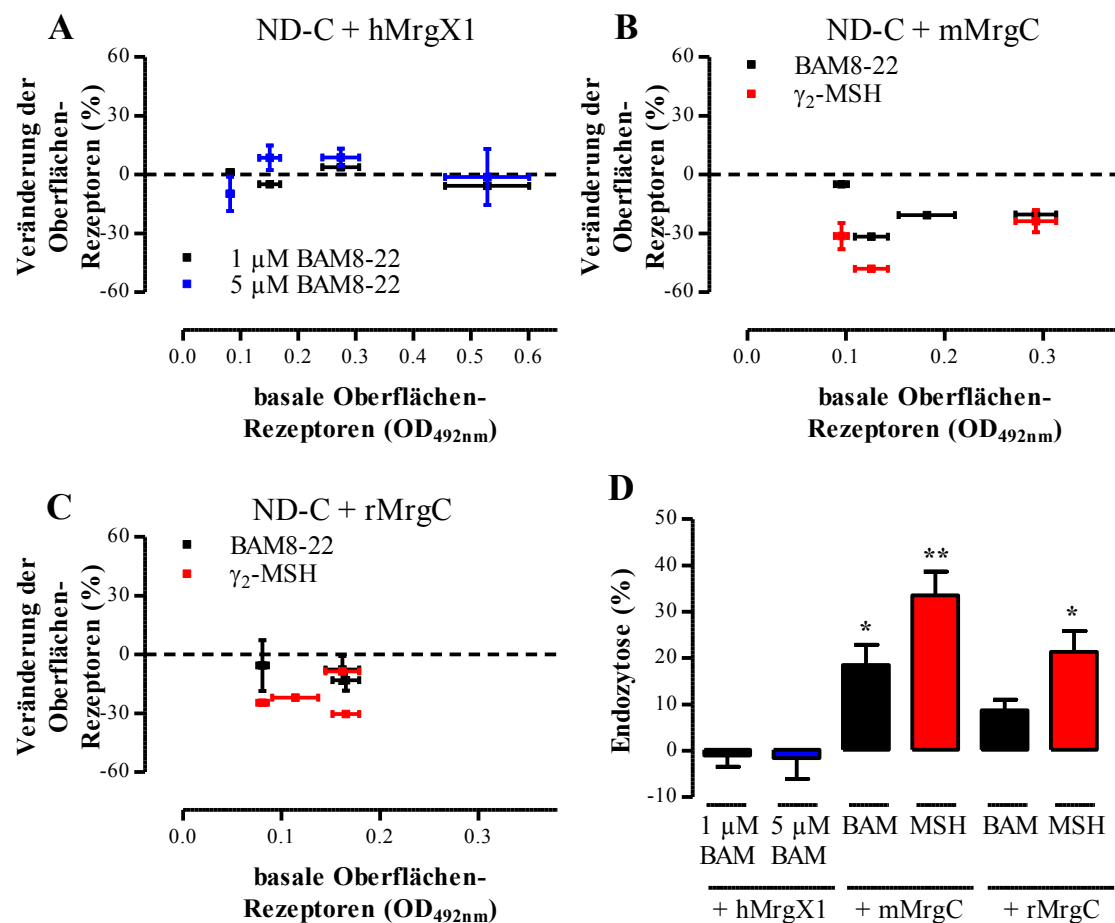


Abbildung 5.20: Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in ND-C-Zellen nach transients Expression von hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren

(A - C) Rezeptorendozytose in ND-C-Zellen nach transients Expression des hMrgX1- (A), mMrgC- (B) oder rMrgC-Rezeptors (C) und 30-minütiger Stimulation mit BAM8-22 (BAM, (A): wie angegeben, (B): 1 μ M, (C): 5 μ M) oder γ_2 -MSH (MSH, 1 μ M). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Jeder Datenpunkt repräsentiert ein Experiment, durchgeführt in Quadruplikaten. (D) Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen.

In ND-C-Zellen wurden hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren transient exprimiert, die Zellen wurden für 30 Minuten mit BAM8-22 oder γ_2 -MSH stimuliert und es wurde die Veränderung der Oberflächenexpression der Rezeptoren analysiert. Alle drei

Rezeptoren konnten in ND-C-Zellen mit ähnlichen Expressionsniveaus exprimiert werden (Abbildung 5.20), so dass etwaige Unterschiede im Endozytoseverhalten zwischen den drei Rezeptoren auch in diesem Zellsystem nicht aus distinkten Rezeptorexpressionsniveaus resultieren können. Ansonsten konnte in ND-C-Zellen das Bild aus F11- oder HEK293-Zellen bestätigt werden. Während der hMrgX1-Rezeptor wiederum resistent gegenüber der Liganden-induzierten Endozytose war (Abbildung 5.20A und D), wurden beide MrgC-Rezeptoren signifikant endozytiert (Abbildung 5.20B bis D).

Damit konnten im Rahmen dieser Arbeit gravierende Unterschiede in der Liganden-vermittelten Endozytose zwischen hMrgX1-Rezeptoren und seinen nächsten Verwandten in Nagetieren, den MrgC-Rezeptoren, nach transienter oder stabiler Expression in drei unterschiedlichen Zellsystemen nachgewiesen werden.

5.2.5 Liganden-induzierte Endozytose des mMrgC-Rezeptors über β -Arrestine

Nachdem das Spezies-spezifische Endozytoseverhalten nach andauernder Ligandenstimulation durch die Nutzung einer Vielzahl von Zellsystemen etabliert werden konnte, stellte sich die Frage nach einer molekularen Erklärung für diesen Phänotyp. Eine mögliche Erklärung könnte dabei in einer unterschiedlichen Affinität von hMrgX1- bzw. MrgC-Rezeptoren zur Endozytosemaschinerie bestehen. Ein entscheidender Schritt bei der Liganden-induzierten Endozytose ist die Bindung von β -Arrestin-Molekülen an den Agonist-gebundenen und durch GRK phosphorylierten GPCR (vgl. Abschnitt 3.1.7). β -Arrestine fungieren danach als Adapterproteine, durch die viele GPCR in Klathrin-besetzte Endosomen endozytiert werden (Ferguson, 2001). COS7-Zellen bieten als Zellsystem mit einer äußerst geringen, endogenen β -Arrestin-Expression (Menard, 1997, Zhang, 1997) die Möglichkeit, einer unterschiedlichen β -Arrestin-Bindung durch hMrgX1- im Vergleich mit MrgC-Rezeptoren nachzugehen.

Dafür wurden hMrgX1- oder mMrgC-Rezeptoren transient in COS7-Zellen exprimiert und die BAM8-22-abhängige Rezeptorendozytose wurde untersucht. Interessanterweise verhielt sich der mMrgC-Rezeptor im COS7-Zellsystem anders als in den bisher getesteten Zellen. Hier konnte weder für den mMrgC-, noch für den hMrgX1-Rezeptor eine signifikante Rezeptorendozytose detektiert werden (Abbildung 5.21). Dies könnte auf die Notwendigkeit einer genügend hohen β -Arrestin-Expression für die mMrgC-Rezeptorendozytose hindeuten. Um dies zu bestätigen, wurden mMrgC- oder hMrgX1-Rezeptor transient-exprimierende COS7-Zellen zusätzlich mit Expressionskonstrukten für β -Arrestin-1 oder -2 transfiziert (vgl. Abschnitt 4.1.8.4). Diese Behandlung hatte keinen Einfluss auf die Endozytoseresistenz des hMrgX1-Rezeptors. Allerdings konnte durch die Erhöhung des Expressionsniveaus von β -Arrestin-1 oder -2 BAM8-22 die Möglichkeit wiedergegeben werden, den mMrgC-Rezeptor zu endozytieren (Abbildung 5.21). Dieser Befund ermöglicht es, den mMrgC-Rezeptor innerhalb der endozytierenden Rezeptoren in die Gruppe der β -Arrestin-abhängigen

Ergebnisse

GPCR einzusortieren (vgl. Abschnitt 3.1.7.3). Außerdem liefert er gute Hinweise darauf, dass eine höhere Affinität von MrgC-Rezeptoren zu β -Arrestinen eine mögliche Erklärung für die fehlende Liganden-abhängige Endozytose der hMrgX1-Rezeptoren darstellt.

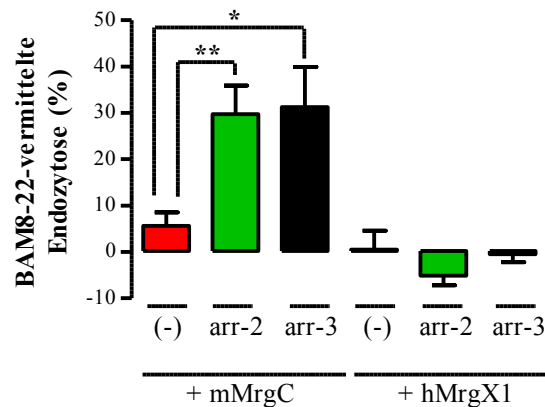


Abbildung 5.21: BAM8-22-induzierte Rezeptorendozytose in COS7-Zellen nach transients Expression von hMrgX1- oder mMrgC-Rezeptoren

Rezeptorendozytose in COS7-Zellen nach transients Expression des hMrgX1- oder mMrgC-Rezeptors ohne ((-)) oder mit Ko-Expression der β -Arrestine, Arrestin-2 (arr-2) oder Arrestin-3 (arr-3). Die Zellen wurden für 30 Minuten mit BAM8-22 (1 μ M) stimuliert. In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen. Es wurden fünf unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

In dieser Arbeit konnten deutliche Unterschiede zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren herausgearbeitet werden. Es zeigte sich ein signifikant unterschiedliches Ligandenprofil (vgl. Abschnitt 5.1), sowie eine gegenteilige Regulation durch anhaltende Ligandenstimulation. Dies deutet darauf hin, dass MrgC-Rezeptoren in Nagetieren kein adäquates Modellsystem für den hMrgX1-Rezeptor darstellen. Diese Einschätzung wird auch von anderen Gruppen geteilt, allerdings damit begründet, dass es sich um nicht homologe Proteine handelt (Burstein, 2006, Chen, 2004). In dieser Arbeit werden daher verschiedene Spinalganglienneuronen-ähnliche Expressionsmodelle genutzt, um neue Signalwege und Zielstrukturen des hMrgX1-Rezeptors zu etablieren und so dessen putativ pro-algetische Funktion zu analysieren.

5.3 Duale funktionelle Regulation des TRPV1 durch hMrgX1-Rezeptoren

5.3.1 Funktionelle Interaktion in HEK293-hMrgX1-TRPV1-Zellen

5.3.1.1 Etablierung der HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zelllinie

hMrgX1-Rezeptoren werden innerhalb des Nervensystems hoch-spezifisch in nozizeptiven Spinalganglienneuronen bzw. in nozizeptiven Neuronen des *Ganglion trigeminale* exprimiert (Lembo, 2002). In Makaken wird der nah verwandte MrgX2-Rezeptor dort mit dem TRPV1-Ionenkanal ko-exprimiert (Zhang, 2005a). Die Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals auf zellulärer Ebene, resultierend in einem nicht selektiven Kationeneinstrom, kann belastbar in eine akute Nozizeption auf der Ebene des gesamten Organismus übersetzt werden. Da in Menschen die Applikation von BAM8-22 in die Haut (Sikand, 2011) als schmerzhaft beschrieben wurde (vgl. Abschnitt 3.3.2.4), sollte im Rahmen dieser Arbeit einer potentiellen funktionellen Interaktion zwischen hMrgX1-Rezeptoren und dem TRPV1-Ionenkanal nachgegangen werden.

Zunächst wurde eine mögliche funktionelle Interaktion in HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen, welche sowohl den hMrgX1-Rezeptor als auch den TRPV1-Ionenkanal stabil exprimieren (vgl. Tabelle 4.4), analysiert. In Abbildung 5.22A und B ist zu erkennen, dass HEK293-hMrgX1/TRPV1-, nicht jedoch HEK293-hMrgX1-Zellen durch die TRPV1-Ko-Expression in die Lage versetzt werden, mit einem sehr deutlichen Ca^{2+} -Signal auf eine Stimulation mit dem TRPV1-Agonisten CAP zu reagieren (Caterina, 1997). Die Spezifität dieses Liganden-induzierten Ca^{2+} -Einstroms konnte durch den selektiven TRPV1-Blocker N-Butylphenyl-3-chloropyridin-tetrahydropyrazin-1-carboxamid (BCTC) nachgewiesen werden (Valenzano, 2003), da beide HEK293-Zelllinien unter TRPV1-Blockade gleichermaßen nicht mehr auf CAP reagieren konnten (Abbildung 5.22A und B). Das Vorhandensein des hMrgX1-Rezeptors an der Zelloberfläche wurde auch in HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen durch den Nachweis der Oberflächenexpression des hMrgX1-Rezeptors verifiziert (Abbildung 5.22C). Es ergab sich dabei ein Expressionsniveau des hMrgX1-Rezeptors von $0,11 \pm 0,01$. Die Regulation des hMrgX1-Rezeptors durch anhaltende Ligandenstimulation entspricht den bisher erhobenen Daten (vgl. Abschnitt 5.2), da eine 30-minütige Stimulation mit BAM8-22, BAM1-22 oder γ_2 -MSH, ebenso wie in HEK293-hMrgX1-Zellen, nicht zu einer Rezeptorendozytose führte (Abbildung 5.22D).

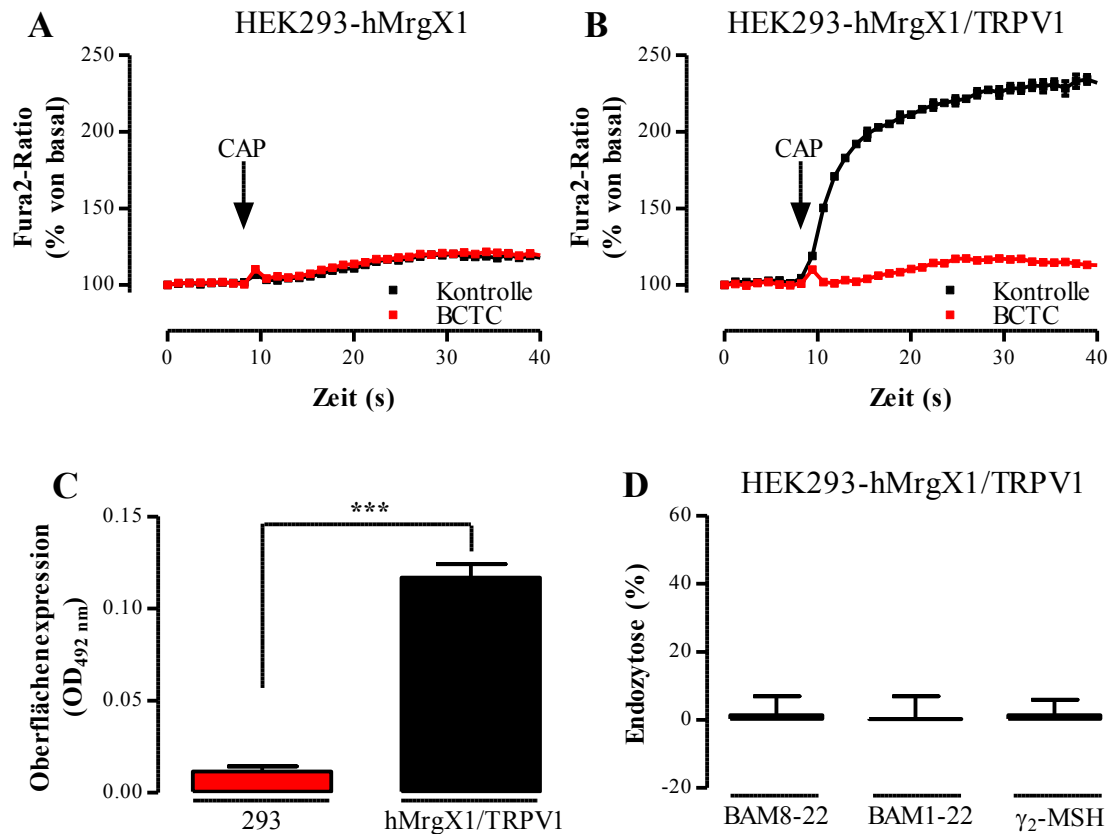


Abbildung 5.22: Charakterisierung der HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zelllinie

(A und B) Ca^{2+} -Signale in HEK293-hMrgX1- (A) und HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen (B) nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von CAP (1 μM). Zur Blockade von TRPV1-abhängigen Ca^{2+} -Signalen wurden in einigen Zellen der TRPV1-Blocker BCTC (100 nM) vorinkubiert bzw. zur Kontrolle das Lösungsmittel Ethanol (0,01 %) eingesetzt. (C) Nachweis von Xpress-Epitop-Rezeptor-Fusionsproteinen an der Zelloberfläche mittels ELISA in nicht transfizierten (293) oder hMrgX1 und TRPV1 stabil-ko-exprimierenden HEK293-Zellen (hMrgX1/TRPV1). (D) hMrgX1-Rezeptorendozytose in HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen nach 30-minütiger Stimulation mit BAM8-22, BAM1-22 oder γ_2 -MSH (alle 1 μM). In jedem Experiment wurden nicht stimulierte Zellen zur Normierung mitgeführt. Die Liganden-induzierte Veränderung des ELISA-Signals wurde berechnet und ist als Endozytose in % aufgetragen. Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

5.3.1.2 Aktivierung des TRPV1 durch BAM8-22

Nach der ausreichende Charakterisierung der HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zelllinie sollte in einem nächsten Schritt untersucht werden, ob BAM8-22-induzierte Ca^{2+} -Signale durch die Ko-Expression des TRPV1 moduliert werden. Dafür wurden HEK293-hMrgX1- bzw. HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen mit BAM8-22 stimuliert und die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration analysiert (Abbildung 5.23A). Es fällt auf, dass das resultierende Ca^{2+} -Signal in den ersten Sekunden nach der Injektion unverändert ist (Fura2-Ratio zum Zeitpunkt 18 Sekunden: HEK293-hMrgX1: 167 ± 5 %; HEK293-hMrgX1/TRPV1: 161 ± 8 %). Sodann ändert sich der Verlauf der Kurven jedoch in Abhängigkeit von der Ko-Expression des TRPV1. Während die Kurve in den HEK293-hMrgX1-Zellen wieder abfällt (Fura2-Ratio zum Zeitpunkt 40 Sekunden: 143 ± 4 %), steigt sie in HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen sogar leicht an (Fura2-Ratio zum Zeitpunkt

Ergebnisse

40 Sekunden: 178 ± 9 %). Über den gesamten Messzeitraum nach der Injektion resultiert daraus eine Zunahme des Ca^{2+} -Signals um ~ 30 % von 1635 ± 137 auf 2100 ± 103 .

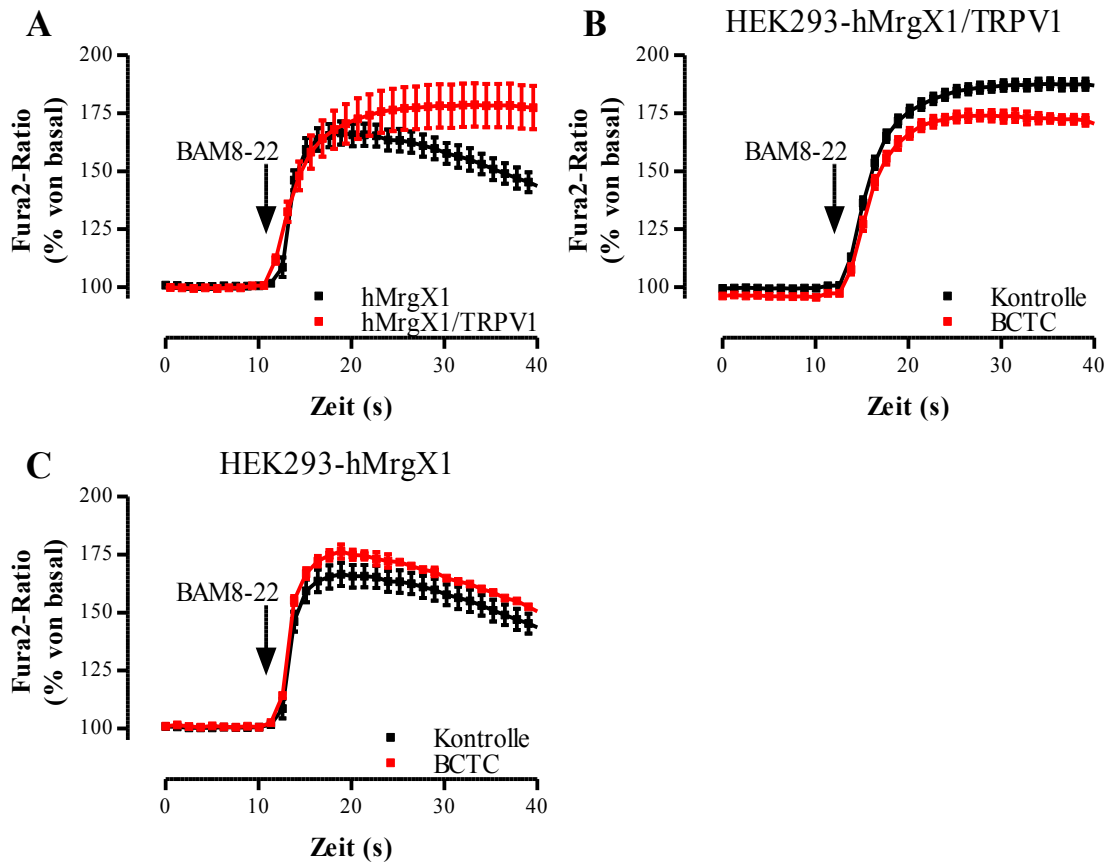


Abbildung 5.23: BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Signale in HEK293-hMrgX1- und HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen

(A - C) Ca^{2+} -Signale in HEK293-hMrgX1/TRPV1- (A und B) und HEK293-hMrgX1-Zellen (A und C) nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von BAM8-22 (1 µM). Zur Blockade von TRPV1-abhängigen Ca^{2+} -Signalen wurden in einigen Zellen der TRPV1-Blocker BCTC (100 nM) vorinkubiert bzw. zur Kontrolle das Lösungsmittel Ethanol (0,01 %) eingesetzt (B und C). Es wurden jeweils drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Dieser Anfangsbefund könnte durch eine hMrgX1-vermittelte Aktivierung des TRPV1 mit zusätzlichem Ca^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum zu erklären sein. Wenn diese Hypothese richtig ist, müsste die Vorbehandlung von HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen mit dem TRPV1-Blocker BCTC dazu führen, dass das BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Signal partiell inhibiert wird. In Abbildung 5.23B ist ersichtlich, dass BCTC in der Lage war, das BAM8-22-induzierte Ca^{2+} -Signal von 2196 ± 64 auf 1886 ± 49 zu verringern. Da BCTC keinen inhibierenden Effekt in HEK293-hMrgX1-Zellen (Abbildung 5.23C) auslöste, konnte zusätzlich ausgeschlossen werden, dass BCTC *per se* mit der hMrgX1-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation in HEK293-Zellen interferiert.

Dieser erste Befund einer putativen hMrgX1-vermittelten Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals stellte die Frage nach dem zu Grunde liegenden Signalweg. Dazu müssten verschiedene Signalkomponenten durch zellpermeable, kleine Moleküle inhibiert

werden und es wäre auch sinnvoll, durch geeignete TRPV1-Mutanten auf bestimmte Signalwege zurückzuschließen. Der Nachweis eines selektiven und spezifischen Effektes von solchen Inhibitoren in einer von zwei distinkten Zelllinien (HEK293-hMrgX1 und HEK293-hMrgX1/TRPV1), die auch noch mit unterschiedlich hoher Rezeptorexpression ausgestattet sind (vgl. Abbildung 5.1 und Abbildung 5.22), erscheint allerdings wenig zielführend. Außerdem ist die Generierung von HEK293-hMrgX1-Zellen, welche verschiedene TRPV1-Mutanten stabil ko-exprimieren, sehr zeitaufwendig und beinhaltet immer die Gefahr, dass im Rahmen des Selektionsprozesses ein Phänotyp selektioniert wird, der einen artifiziellen Einfluss auf die geplanten Experimente ausübt. Da zusätzlich der hMrgX1-Rezeptor spezifisch in Spinalganglienneuronen exprimiert wird, wurde im Folgenden die funktionelle Interaktion zwischen hMrgX1-Rezeptor und TRPV1-Ionenkanal in von Spinalganglienneuronen abgeleiteten F11-Zellen analysiert, die den hMrgX1 Rezeptor stabil exprimieren (F11-hMrgX1-Zellen, vgl. Abschnitt 5.1.5) und in denen transient der TRPV1-Ionenkanal ko-exprimiert wurde.

5.3.2 Sensitisierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor in F11-hMrgX1-Zellen

5.3.2.1 Etablierung des Zellmodells

F11-hMrgX1-Zellen sind im Vergleich mit HEK293-Zellen schwieriger zu transfizieren, dies gilt auch für die Expression des TRPV1-Ionenkanals. Daraus ergibt sich das Problem, dass, ausgehend von einer erreichbaren Transfektionseffizienz von 20 bis 50 %, ein erheblicher Teil, nämlich 50 bis 80 % der zu transfizierenden Zellen, den TRPV1 nach einer Transfektion nicht exprimieren werden. Unter der Nutzung eines Loch-Platten-Lesegerätes (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2) wäre in einer solchen Mischpopulation die Messung eines Durchschnittssignals der gesamten Zellpopulation ungeeignet, um spezifische funktionelle Interaktionen zwischen hMrgX1-Rezeptor und TRPV1 zu analysieren, wie es in HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen im Vergleich mit HEK293-hMrgX1-Zellen möglich war. Die Imaging-Technik bietet hingegen die Möglichkeit, Ca^{2+} -Signale einzelner Zellen separat voneinander zu messen (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2). Weiterhin hat sie den Vorteil, neben der Fura2-Fluoreszenz in anderen Fluoreszenzkanälen zu messen und die resultierenden Signale ebenso einzelnen Zellen zuzuordnen. Im Rahmen dieser Arbeit wurden daher TRPV1-Proteine in F11-hMrgX1-Zellen ko-exprimiert, welche an ihrem C-Terminus mit YFP fusioniert worden sind. So war es möglich, basierend auf der Detektion der YFP-Fluoreszenz in transfizierte und damit TRPV1 exprimierende Zellen und in nicht transfizierte Zellen zu trennen. Beide Genotypen konnten so gleichzeitig mit den gleichen Agonisten oder Inhibitoren inkubiert werden.

Ergebnisse

Der TRPV1 ist ein polymodaler Ionenkanal, der durch ganz unterschiedliche Stimuli aktiviert wird. Die drei wichtigsten Klassen an TRPV1-Agonisten stellen Vanilloide, Protonen und Temperatur dar (Caterina, 1997, Tominaga, 1998). Daher sollte zunächst überprüft werden, ob die Expression des TRPV1-YFP-Fusionsproteins in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit TRPV1-Agonisten zu einem selektiven Ca^{2+} -Einstrom in YFP-positiven Zellen führt. Es wurden F11-hMrgX1-Zellen auf Deckgläschen ausgesät, mit dem pcDNA3.1-TRPV1-YFP-Vektor transfiziert und mit Fura2-AM beladen. Am Mikroskop wurde sodann im YFP-Kanal in YFP- und damit TRPV1-positive (TRPV1) und YFP-negative (Mock) Zellen getrennt, bevor im Fura2-Kanal die Ca^{2+} -Signale nach Injektion von CAP gemessen wurden. In Abbildung 5.24A ist zu erkennen, dass diese Behandlung in einem deutlichen Ca^{2+} -Signal in TRPV1-positiven Zellen resultierte, jedoch keinen Effekt in nicht transfizierten Zellen hatte. Damit konnte gezeigt werden, dass eine Einteilung in TRPV1-positive und -negative Zellen auf Grund der YFP-Fluoreszenz valide ist.

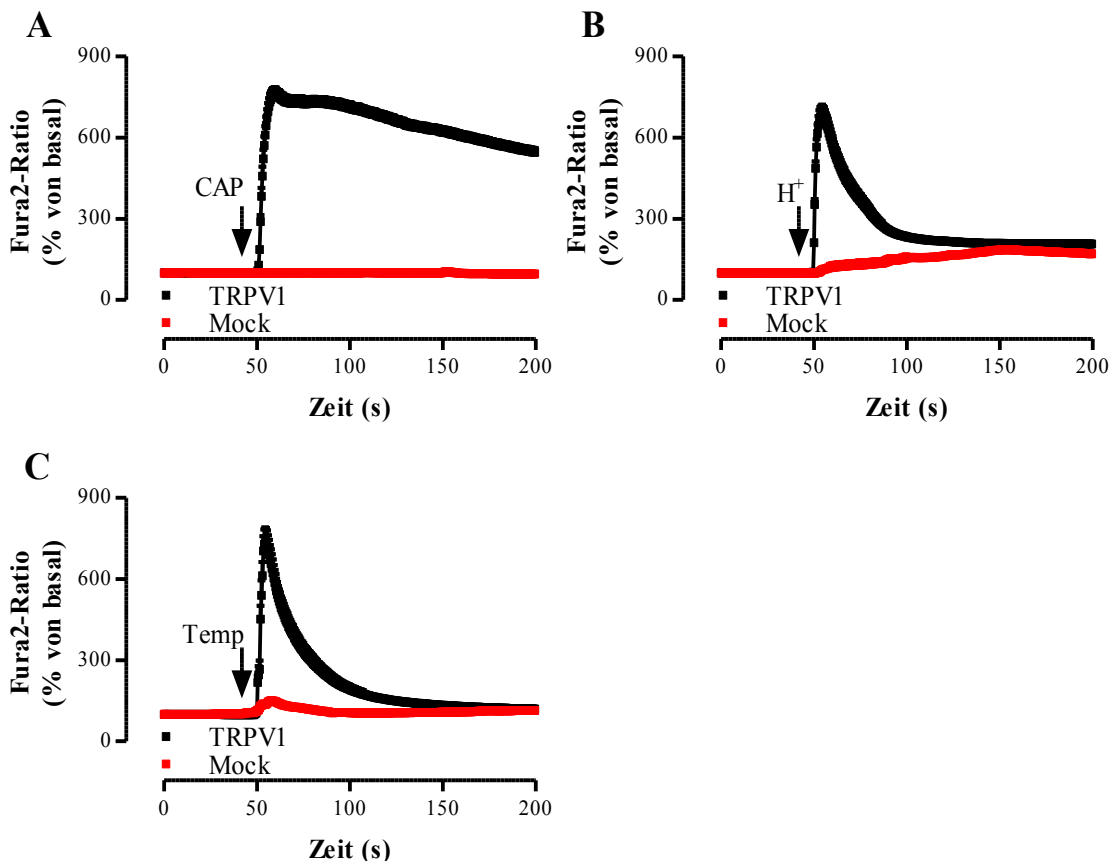


Abbildung 5.24: TRPV1-Agonisten-vermittelte Ca^{2+} -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen

(A - C) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurden CAP (A, 10 nM), Protonen (B, pH 6,2) oder warmer Puffer (C, ca. 42 °C) injiziert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und dabei mindestens 34 einzelne Zellen gemessen.

Weiterhin sollte der TRPV1 durch eine Verringerung des pH-Wertes aktiviert werden. Dies wurde durch die Injektion von HBS-Puffer mit einem pH-Wert von 5,0

bewerkstelligt, wodurch sich der pH-Wert der extrazellulären Lösung von 7,4 auf final 6,2 verringerte. Die Verringerung des pH-Wertes führte nur in TRPV1-positiven Zellen zu einem deutlichen Ca^{2+} -Signal (Abbildung 5.24B). Dieses Signal war, im Vergleich mit dem CAP-induzierten Signal, allerdings deutlich transienter. Dies könnte möglicherweise darin begründet liegen, dass nach der Injektion des pH 5,0 Puffers transient eine deutlich höhere Protonenkonzentration vorgelegen hat, welche dann in relativ kurzer Zeit über das HEPES-basierende Puffersystem auf den pH-Wert von 6,2 zurückgeführt wurde. Auch in Bezug auf die Protonen-induzierten Ca^{2+} -Signale des TRPV1 stellte die YFP-basierte Unterteilung der F11-hMrgX1-Zellen in TRPV1-positive und -negative Zellen eine sehr geeignete Methode dar.

Schließlich sollte auch für die Wärme-vermittelte TRPV1-Aktivierung gezeigt werden, dass nur YFP-positive Zellen mit einem Ca^{2+} -Signal reagieren. Dafür wurde der Puffer auf 55 °C erwärmt und injiziert, so dass sich die extrazelluläre Lösung transient von RT auf 42 °C erwärmte, um dann innerhalb von 30 Sekunden wieder auf eine Temperatur von weniger als 30 °C zu fallen. Diese transiente Erhöhung der Umgebungstemperatur führte nur in TRPV1-exprimierenden (YFP-positiven) Zellen zu einem Ca^{2+} -Signal (Abbildung 5.24C). Damit konnte unter Nutzung der drei wichtigsten TRPV1-Agonisten gezeigt werden, dass der YFP-Nachweis als sehr guter Prädiktor für das Vorhandensein des TRPV1 angesehen werden kann, so dass im Folgenden nur aufgrund der YFP-Fluoreszenz von TRPV1-positiven oder -negativen Zellen gesprochen wird.

5.3.2.2 Sensitisierung des TRPV1 in F11-hMrgX1-Zellen durch Bradykinin

In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung von nozizeptiven Spinalganglienneuronen mit Bradykinin, dem Agonisten des B2R, den TRPV1 gegenüber seinen Agonisten sensitisiert (Cesare, 1999, Chuang, 2001, Vellani, 2001, Cesare, 1996). Interessanterweise konnte dieser Effekt auf eine Bradykinin-vermittelte Aktivierung der PKC und nachfolgende PKC-vermittelte Phosphorylierung von Serin 502 und 800 im TRPV1-Protein zurückgeführt werden (Vellani, 2001, Numazaki, 2002).

F11-Zellen exprimieren den B2R endogen und reagieren auf eine Stimulation mit Bradykinin mit der Produktion von IP_3 (Francel, 1987a) bzw. mobilisieren Ca^{2+} -Ionen aus dem ER (Abbildung 5.9). Daher sollte zunächst überprüft werden, ob in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen eine Vorbehandlung mit Bradykinin zu einer Sensitisierung des TRPV1 führt. Um nur den CAP-induzierten Kationeneinstrom über die Zellmembran zu messen, wurde im Rahmen dieser Versuche die Mn^{2+} -induzierte Fura2-Quenching-Technik genutzt (vgl. Abschnitt 4.2.3.3). F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen wurden mit Bradykinin für 5 Minuten behandelt oder nur in Puffer inkubiert. Sodann wurden die Zellen mit frischem HBS-Puffer überschichtet, die Messung wurde gestartet und es erfolgte nach 25 Sekunden eine Injektion einer MnCl_2 -haltigen Lösung (500 μM Mn^{2+} -

Ergebnisse

Ionen) ohne bzw. mit CAP (5 nM). Die Vorbehandlung mit Bradykinin hatte keinen Einfluss auf die basale TRPV1-Aktivität, so dass aus Gründen der Lesbarkeit nur die basale Kurve (schwarz) ohne Bradykinin-Vorbehandlung in Abbildung 5.25A dargestellt wurde. Aus den gleichen Gründen sind die entsprechenden Kurven TRPV1-negativer Zellen im Zuge der Analyse der TRPV1-Sensitisierung ebenso nicht dargestellt. Es zeigte sich (Abbildung 5.25A), dass die Vorbehandlung mit Bradykinin das Fura2-Quenching durch CAP von 55 ± 2 % auf 43 ± 2 % steigerte (grüne Kurve gegenüber roter Kurve), also zu einer Sensitisierung des TRPV1 führte.

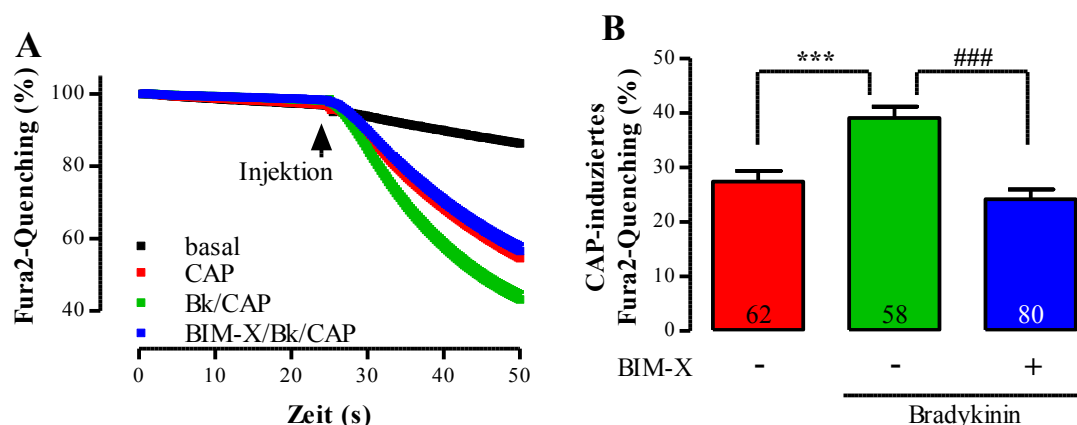


Abbildung 5.25: Sensitisierung des TRPV1 für CAP durch Bradykinin

(A) Fura2-Quenching in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde MnCl_2 (500 μM) oder CAP/ MnCl_2 (5 nM/500 μM) injiziert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) oder BIM-X (1 μM) inkubiert, wobei für die letzten 5 Minuten partiell Bradykinin (Bk, 100 nM) zugesetzt wurde. (B) Das CAP-induzierte Fura2-Quenching zum Zeitpunkt 45 Sekunden wurde durch Subtraktion des jeweiligen basalen Wertes berechnet und ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Durch Subtraktion der jeweiligen „basal“-Kurve (vgl. Abschnitt 4.2.3.3) wurde das CAP-induzierte Fura2-Quenching am Zeitpunkt 45 Sekunden berechnet und in Abbildung 5.25B dargestellt. Es diente als Maß, um die Effekte einer Vorbehandlung statistisch analysieren zu können. Dabei war die Bradykinin-vermittelte Erhöhung des CAP-induzierten Fura2-Quenching von 28 ± 2 % auf 39 ± 2 % höchst signifikant unterschiedlich. 30 Minuten vor der Inkubation mit Bradykinin wurde durch den Einsatz von Bisindolyl-maleimid 10 (BIM-X) spezifisch die Aktivität aller PKC-Isoenzyme inhibiert (Bit, 1993, Wilkinson, 1993), um den sensitisierenden Effekt des Bradykinins auf den TRPV1 zu blockieren. Nach Vorbehandlung mit BIM-X und Bradykinin ergab sich ein CAP-induziertes Fura2-Quenching von 24 ± 2 % (Abbildung 5.25A und B). Mit der Literatur übereinstimmend, konnte durch die BIM-X-Vorbehandlung die komplette Bradykinin-vermittelte Sensitisierung des TRPV1 verhindert werden. Damit konnte in den hier genutzten F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen die PKC-vermittelte TRPV1-Sensitisierung durch den B2R reproduziert werden, so dass in diesem System nachfolgend untersucht werden sollte, ob der hMrgX1-Rezeptor ebenso zu einer Modulation der Agonisten-vermittelten TRPV1-Aktivität in der Lage ist.

5.3.2.3 PKC-abhängige Sensibilisierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor

Nachdem etabliert werden konnte, dass in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen prinzipiell eine GPCR-vermittelte TRPV1-Sensibilisierung ablaufen kann, sollte nun untersucht werden, ob der hMrgX1-Rezeptor auch dazu in der Lage ist. Dafür wurden Zellen für 5 Minuten mit BAM8-22 oder Puffer inkubiert und danach durch Injektion von MnCl_2 -haltiger Lösung mit oder ohne CAP stimuliert. In Abbildung 5.26A und B ist zu erkennen, dass auch eine hMrgX1-Stimulation zur TRPV1-Sensibilisierung für CAP führte, da die Vorbehandlung mit BAM8-22 das CAP-induzierte Fura2-Quenching von $11 \pm 2 \%$ auf $32 \pm 2 \%$ höchst signifikant erhöhte. Nach diesem interessanten Befund sollte durch den Einsatz von BIM-X der Frage nachgegangen werden, ob die PKC, ebenso wie bei der B2R-vermittelten TRPV1-Sensibilisierung, an der hMrgX1-induzierten TRPV1-Sensibilisierung für CAP beteiligt ist. Die BIM-X-Vorinkubation konnte die TRPV1-Sensibilisierung nahezu vollständig inhibieren (CAP-induziertes Fura2-Quenching: $14 \pm 2 \%$), so dass der hMrgX1-Rezeptor PKC-vermittelt den TRPV1 für CAP sensibilisiert (Abbildung 5.26A und B). Dieser Befund sollte sodann auf andere TRPV1-Agonisten ausgeweitet werden, so dass nachfolgend untersucht wurde, ob die Vorinkubation mit BAM8-22 ebenso zu einer Sensibilisierung des TRPV1 gegenüber Protonen und Temperatur führt. In Abbildung 5.26C-F ist zu sehen, dass der hMrgX1-Rezeptor in der Lage ist, den TRPV1 ebenso für Protonen und Temperatur zu sensibilisieren. Wiederum konnte durch den Einsatz von BIM-X gezeigt werden, dass die PKC an diesem Signalweg entscheidend beteiligt ist, so dass die TRPV1-Sensibilisierung für verschiedene Agonisten möglicherweise einen gemeinsamen Signalweg darstellt.

Serin 502 bzw. 800 im TRPV1-Protein stellen die Phosphorylierungsstellen dar, über welche die PKC-vermittelte Sensibilisierung des TRPV1 vermittelt wird (Numazaki, 2002). Durch den Austausch dieser Serine zu Alanin könnte somit die Sensibilisierung des TRPV1 durch die PKC ebenso inhibiert werden, wie durch einen PKC-Inhibitor. Nach Expression von TRPV1-S502A-YFP oder -S800A-YFP wurden F11-hMrgX1-Zellen für 5 Minuten mit BAM8-22 inkubiert, bevor durch die Aktivierung des TRPV1 mittels Injektion von CAP (5 nM) das Mn^{2+} -vermittelte Fura2-Quenching induziert wurde (Abbildung 5.27). Die Stimulation der TRPV1-S502A-Mutante mit CAP ergab ein Fura2-Quenching von $16 \pm 2 \%$ oder $16 \pm 1 \%$ für nicht vorstimulierte bzw. mit BAM8-22 vorstimulierte Zellen. Nach der Expression der TRPV1-S800A-Mutante betrugen die entsprechenden Werte jeweils $44 \pm 2 \%$. Demnach konnte durch die Vorbehandlung mit BAM8-22 keine Steigerung des Fura2-Quenching erreicht werden. Hier ist darauf hinzuweisen, dass das Fura2-Quenching-Signal durch eine Konzentration von 5 nM CAP nicht gesättigt wurde. D. h. in diesen Zellen wäre es prinzipiell möglich gewesen, ein höheres Maß an TRPV1-abhängigem Fura2-Quenching zu messen (beispielsweise durch die Applikation einer höheren Konzentration von CAP).

Ergebnisse

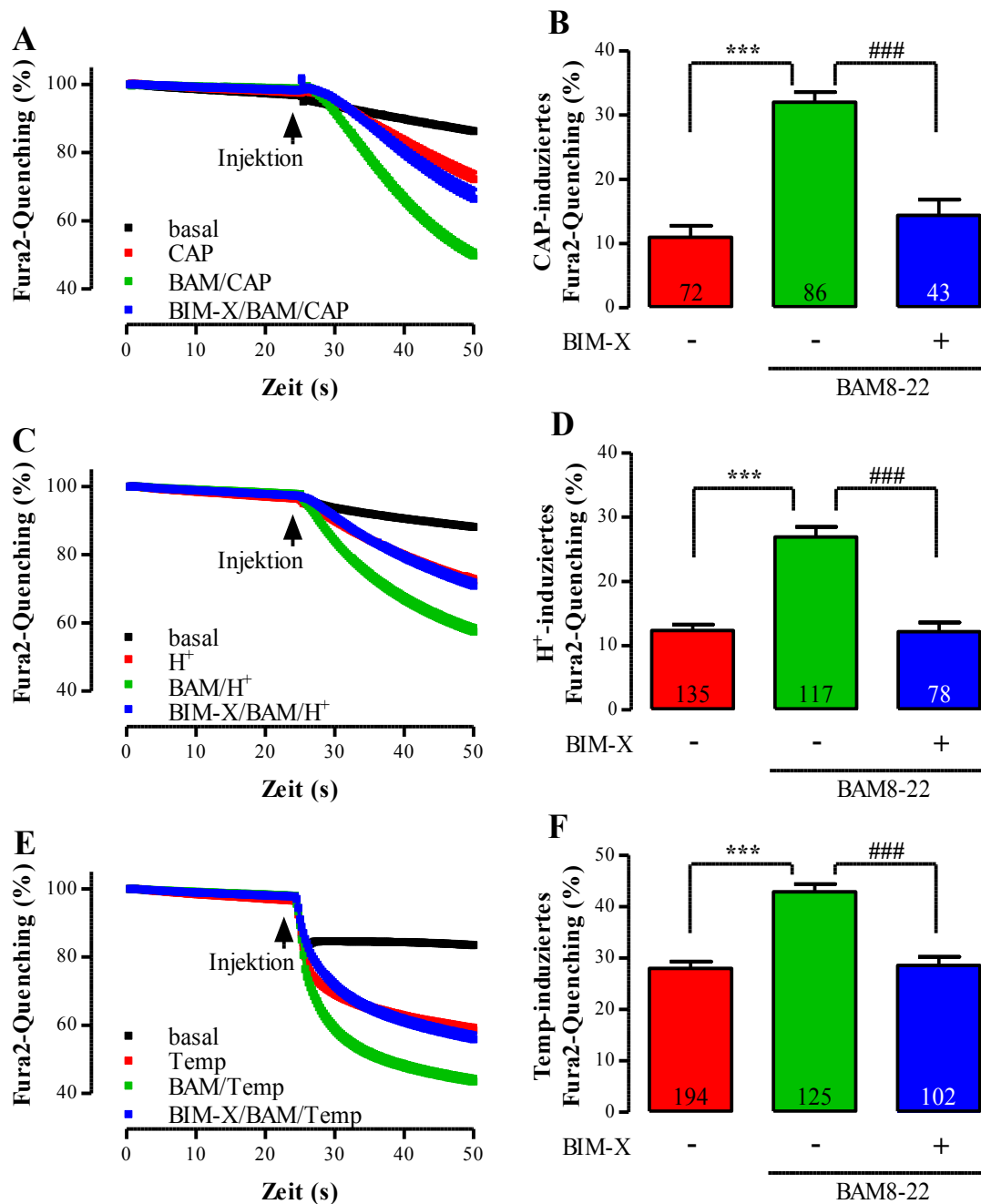


Abbildung 5.26: Sensitisierung des TRPV1 für CAP, Protonen und Temperatur durch BAM8-22

(A, C und E) Fura2-Quenching in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. (A, C und E) Es wurde MnCl₂ (500 µM), CAP/MnCl₂ (A, 5 nM/500 µM), H⁺/MnCl₂ (B, pH 6,9/500 µM) oder erwärmter Puffer (Temp)/MnCl₂ (C, ca. 43 °C/500 µM) injiziert. Die Zellen wurden für 30 Minuten mit DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) oder BIM-X (1 µM) vorinkubiert, wobei für die letzten 5 Minuten partiell BAM8-22 (BAM, 2 µM) zugesetzt wurde. (B, D und F) Das Agonisten-induzierte Fura2-Quenching zum Zeitpunkt 45 Sekunden wurde durch Subtraktion des jeweiligen basalen Wertes berechnet und ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Damit führte das Fehlen einer der beiden PKC-Phosphorylierungsstellen, im deutlichen Unterschied zum WT-TRPV1 (vgl. Abbildung 5.26), zu einer völligen Blockade der hMrgX1-abhängigen TRPV1-Sensitisierung. Dieser Befund steht in absoluter Kongruenz zu den Befunden der pharmakologischen PKC-Blockade aus Abbildung 5.26 und ergibt eine hMrgX1-vermittelte TRPV1-Sensitisierung über eine

PKC-vermittelte Phosphorylierung von Serin 502 und 800 des TRPV1-Proteins. Damit kann der hMrgX1-Rezeptor in die große Gruppe der TRPV1 sensitisierenden GPCR eingereiht werden (Dai, 2004, Moriyama, 2003, Ohta, 2006, Plant, 2007, Tominaga, 2001, Vellani, 2010, Moriyama, 2005).

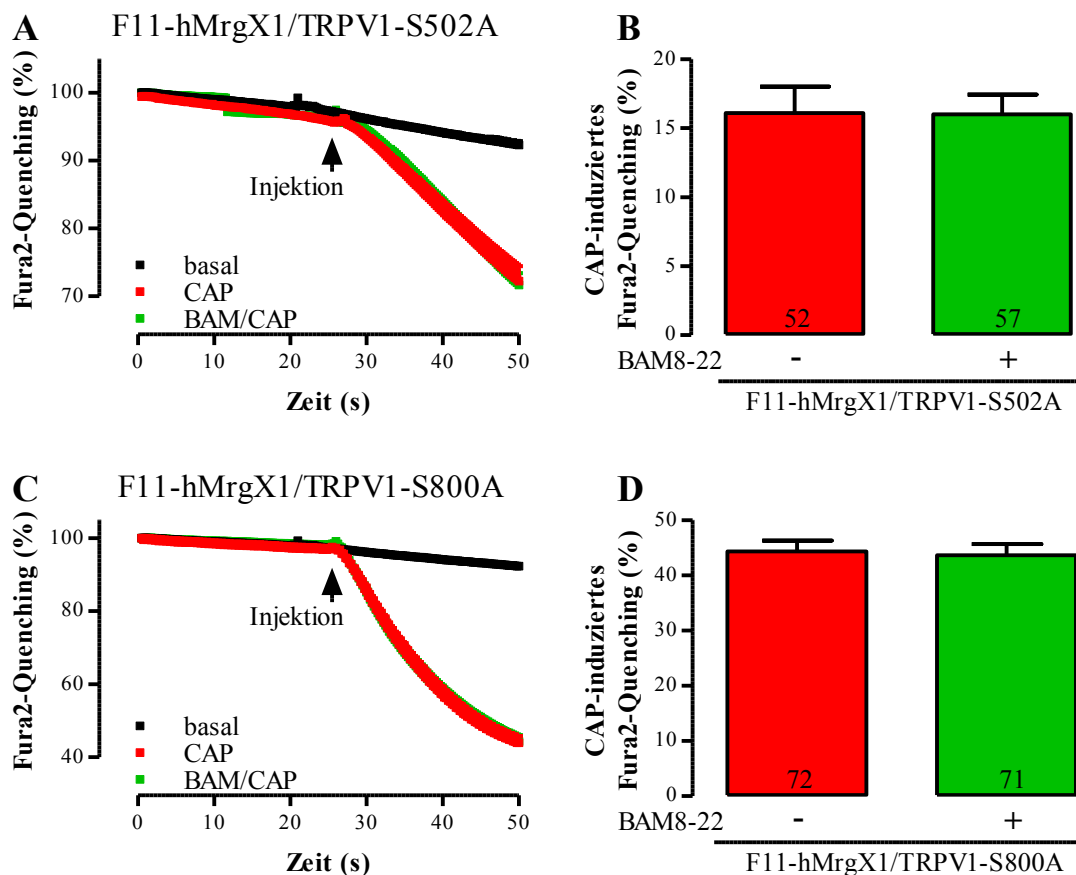


Abbildung 5.27: Keine Sensitisierung des TRPV1-S502A oder -S800A durch BAM8-22

(A und B) Fura2-Quenching in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression der TRPV1-S502A- (A) oder der TRPV1-S800A-Mutante (C) und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde MnCl_2 (500 μM) oder CAP/ MnCl_2 (5 nM/500 μM) injiziert, wobei einigen Zellen für 5 Minuten mit BAM8-22 (BAM, 2 μM) vorinkubiert wurden. (B und C) Das Agonisten-induzierte Fura2-Quenching zum Zeitpunkt 45 Sekunden wurde durch Subtraktion des jeweiligen basalen Wertes berechnet und ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

5.3.3 Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor in F11-hMrgX1-Zellen

5.3.3.1 Messung der direkten TRPV1-Aktivierung mittels Mn^{2+} -induziertem Fura2-Quenching

Im Vergleich zur TRPV1-Sensitisierung ist sehr wenig über die GPCR-vermittelte direkte Aktivierung des TRPV1 ohne Zugabe eines Ionenkanalagonisten bekannt. So wird der TRPV1, ganz im Gegensatz zu Mitgliedern der klassischen TRPC-Familie (Gudermann, 2004), nicht als Rezeptor-operierter Kanal im engeren Sinne angesehen. Die in HEK293-

Ergebnisse

Zellen beschriebenen Daten eines verlängerten BAM8-22-induzierten Ca^{2+} -Signals nach TRPV1-Ko-Expression (vgl. Abschnitt 5.3.1.2) lassen sich hingegen sehr gut durch eine hMrgX1-vermittelte direkte Aktivierung des TRPV1 erklären. Daher sollte zunächst auch in F11-hMrgX1-Zellen überprüft werden, ob der TRPV1 metabotrop durch den hMrgX1-Rezeptor direkt aktiviert wird. Um unabhängig von der GPCR-abhängigen PLC- β -vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER zu sein, wurde die TRPV1-Aktivierung zunächst mittels Mn^{2+} -abhängigem Fura2-Quenching überprüft.

In F11-hMrgX1-Zellen, die den TRPV1 nicht exprimieren, führte die Stimulation mit BAM8-22 zu einem signifikanten Mn^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum (Abbildung 5.28A und B). So wurde das Fura2-Quenching durch BAM8-22 von $7,6 \pm 0,4 \%$ auf $14,2 \pm 0,5 \%$ erhöht (vgl. Abschnitt 4.2.3.3). Dieser Einstrom ist nicht sensitiv gegenüber dem spezifischen TRPV1-Blocker BCTC, womit deutlich wird, dass es sich um einen TRPV1-unabhängigen Einstrom handelt. Der Grund für diesen interessanten Befund bleibt jedoch für den Moment unklar und muss im Rahmen weiterer Studien untersucht werden.

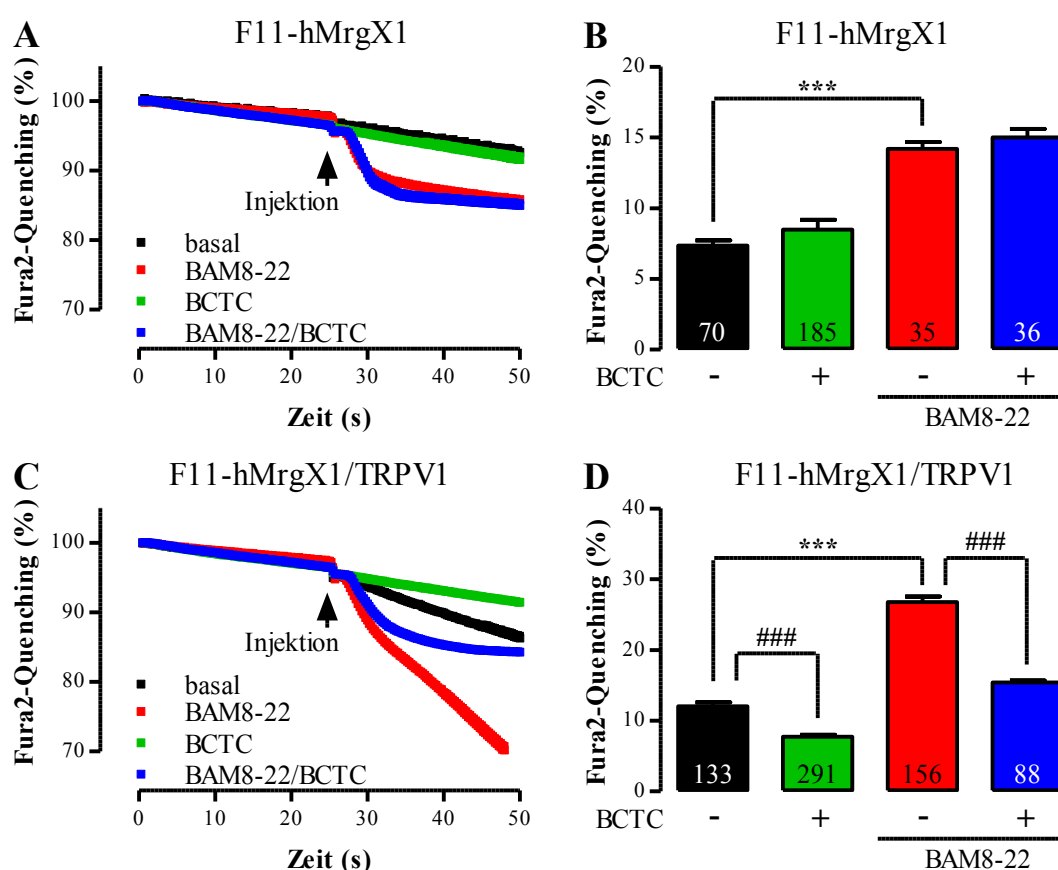


Abbildung 5.28: Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor (Fura2-Quenching)
 (A und C) Fura2-Quenching in F11-hMrgX1-Zellen (A) oder in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 (C) und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde MnCl_2 (basal, 500 μM) oder BAM8-22/ MnCl_2 (2 μM /500 μM) injiziert, wobei einigen Zellen für 5 Minuten mit BCTC (500 nM) vorinkubiert wurden. (B und D) Das Mn^{2+} -induzierte Fura2-Quenching wurde durch Subtraktion der jeweiligen Fura2-Fluoreszenz vor der Injektion vom Wert zum Zeitpunkt 45 Sekunden berechnet und ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

In F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen führte die hMrgX1-Stimulation mit BAM8-22 im Vergleich mit TRPV1-negativen Zellen zu einer Erhöhung des Fura2-Quenching von $12,0 \pm 0,5 \%$ auf $26,8 \pm 0,8 \%$ (Abbildung 5.28C, rote Kurve). Dieser zusätzliche Anteil des Mn^{2+} -Einstroms ist komplett durch BCTC zu blockieren (Abbildung 5.28C und D), so dass unter TRPV1-Blockade ein BAM8-22-vermitteltes Fura2-Quenching von $15,4 \pm 0,3 \%$ zu verzeichnen ist. Dieser Wert unterscheidet sich demnach nicht mehr signifikant vom BAM8-22-induzierten Fura2-Quenching in F11-hMrgX1-Zellen. Damit konnten erste Daten einer direkten hMrgX1-vermittelten Aktivierung des TRPV1 bei RT und neutralem pH-Wert in F11-hMrgX1-Zellen gewonnen werden.

Da die PKC-vermittelte Phosphorylierung des TRPV1 eine herausragende Rolle bei der GPCR-vermittelten Sensibilisierung gegenüber seinen Agonisten spielt und auch komplett für die hMrgX1-induzierte TRPV1-Sensibilisierung verantwortlich ist (Abschnitt 5.3.2.3), sollte nun geklärt werden, ob die PKC auch an der direkten Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor beteiligt ist. Durch Vorinkubation von F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen mit BIM-X wurde wiederum die PKC-Aktivität blockiert (Abbildung 5.29). Dies hatte jedoch, im Unterschied zur Sensibilisierung (Abbildung 5.26), keinen Effekt auf die BAM8-22-vermittelte direkte Aktivierung des TRPV1, da das ermittelte Fura2-Quenching mit $8,4 \pm 0,8 \%$ bzw. $8,6 \pm 0,6 \%$ durch BIM-X nicht verändert wurde. Somit scheint die PKC nicht an der hMrgX1-vermittelten direkten Aktivierung des TRPV1 beteiligt zu sein.

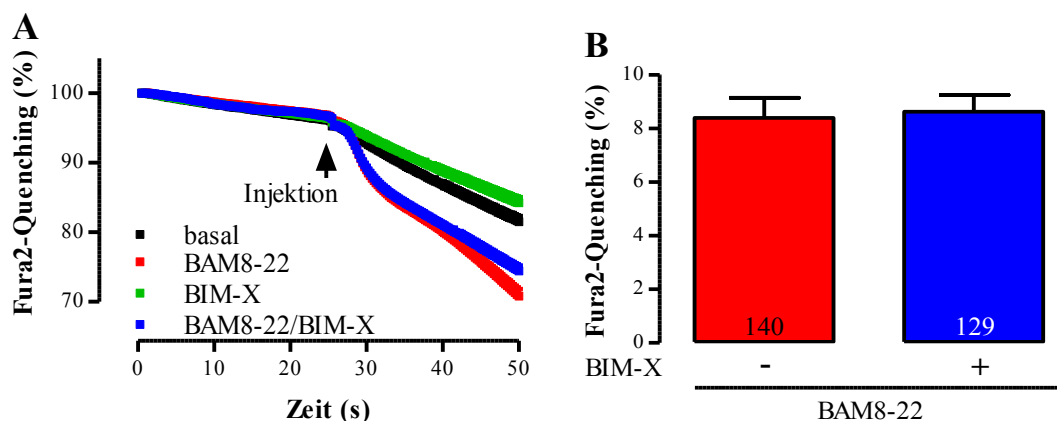


Abbildung 5.29: PKC-unabhängige hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung (Fura2-Quenching)

(A) Fura2-Quenching in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde $MnCl_2$ (basal, $500 \mu M$) oder BAM8-22/ $MnCl_2$ ($2 \mu M/500 \mu M$) injiziert, wobei die Zellen für 30 Minuten mit DMSO ($0,1 \%$, keine Beschriftung) oder BIM-X ($1 \mu M$) vorinkubiert wurden. (B) Das BAM8-22-induzierte Fura2-Quenching wurde durch Subtraktion der jeweiligen Fura2-Fluoreszenz vor der Injektion vom Wert zum Zeitpunkt 45 Sekunden berechnet und ist als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

5.3.3.2 Messung der direkten TRPV1-Aktivierung mittels Ca^{2+} -Imaging

Als zusätzliche Technik zur Analyse einer metabotropen hMrgX1-induzierten direkten TRPV1-Aktivierung wurde im Rahmen dieser Arbeit der Einfluss der TRPV1-Ko-Expression auf hMrgX1-vermittelte Ca^{2+} -Signale untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.2). In

Ergebnisse

Abbildung 5.30A und B ist zu erkennen, dass die Stimulation mit BAM8-22 in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen im Vergleich mit Mock-Zellen zu einem stark verlängerten Ca^{2+} -Signal führte, dessen Stärke über den dargestellten Zeitraum von $11 \pm 0,4$ auf 56 ± 2 um etwa das 4,5-fache zunahm. Dieser Befund bestätigt den BAM8-22-induzierten verstärkten Mn^{2+} -Einstrom in TRPV1-positiven F11-hMrgX1-Zellen (Abschnitt 5.3.3.1) und die partielle BCTC-Sensitivität des BAM8-22-induzierten Ca^{2+} -Signals in HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen (Abschnitt 5.3.1.2).

Wiederum wurde auch in diesem experimentellen Ansatz der TRPV1-Blocker BCTC genutzt, um in TRPV1-positiven Zellen die hMrgX1-vermittelte Ionenkanal-aktivierung zu blockieren. In Abbildung 5.30C und D ist dargestellt, dass unter Blockade des TRPV1 nicht mehr zu unterscheiden ist, ob eine Zelle den TRPV1 exprimiert oder nicht und dass die resultierenden Ca^{2+} -Signale mit $11 \pm 0,4$ bzw. 9 ± 2 nicht mehr signifikant differieren. Damit konnte wiederum eine hMrgX1-vermittelte direkte Aktivierung des TRPV1 nachgewiesen werden.

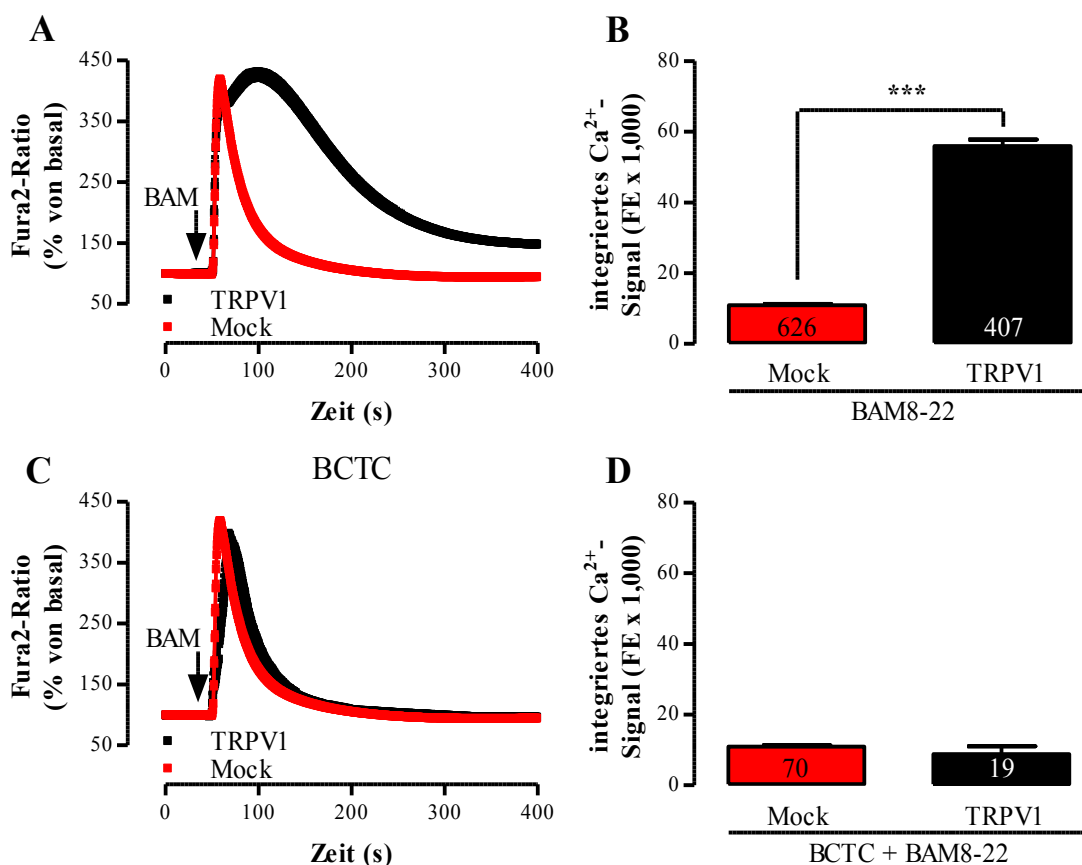


Abbildung 5.30: Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor (Ca^{2+} -Imaging)
 (A und C) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μM) injiziert und in (C) für 5 Minuten mit BCTC (500 nM) vorinkubiert. (B und D) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Nachfolgend sollte untersucht werden, ob die direkte TRPV1-Aktivierung, analog zu Abschnitt 5.3.3.1, unabhängig von PKC-Aktivität ist. Daher wurde nach

Ergebnisse

Vorinkubation des PKC-Inhibitors BIM-X oder unter Nutzung der TRPV1-S502A- bzw. -S800A-Mutante BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Signale untersucht. Innerhalb der TRPV1-positiven F11-hMrgX1-Zellen vermittelte die PKC-Blockade durch BIM-X, im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO, keinen inhibitorischen Effekt auf die BAM8-22-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung (Abbildung 5.31A und B). BAM8-22 induzierte ein Ca^{2+} -Signal von 50 ± 5 bzw. 52 ± 3 , so dass auch mit diesem experimentellen Ansatz keine PKC-Beteiligung an der direkten Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor nachgewiesen werden konnte. Zusätzlich wurden die beiden PKC-Phosphorylierungsmutanten TRPV1-S502A bzw. -S800A sehr deutlich durch die Stimulation mit BAM8-22 aktiviert, was am Vorhandensein einer zweiten Phase des Ca^{2+} -Signals erkennbar ist (Abbildung 5.31C und D). Damit konnte auch über einen molekularbiologischen Ansatz nachgewiesen werden, dass die hMrgX1-vermittelte Aktivierung des TRPV1 bei RT und neutralem pH-Wert PKC-unabhängig ist.

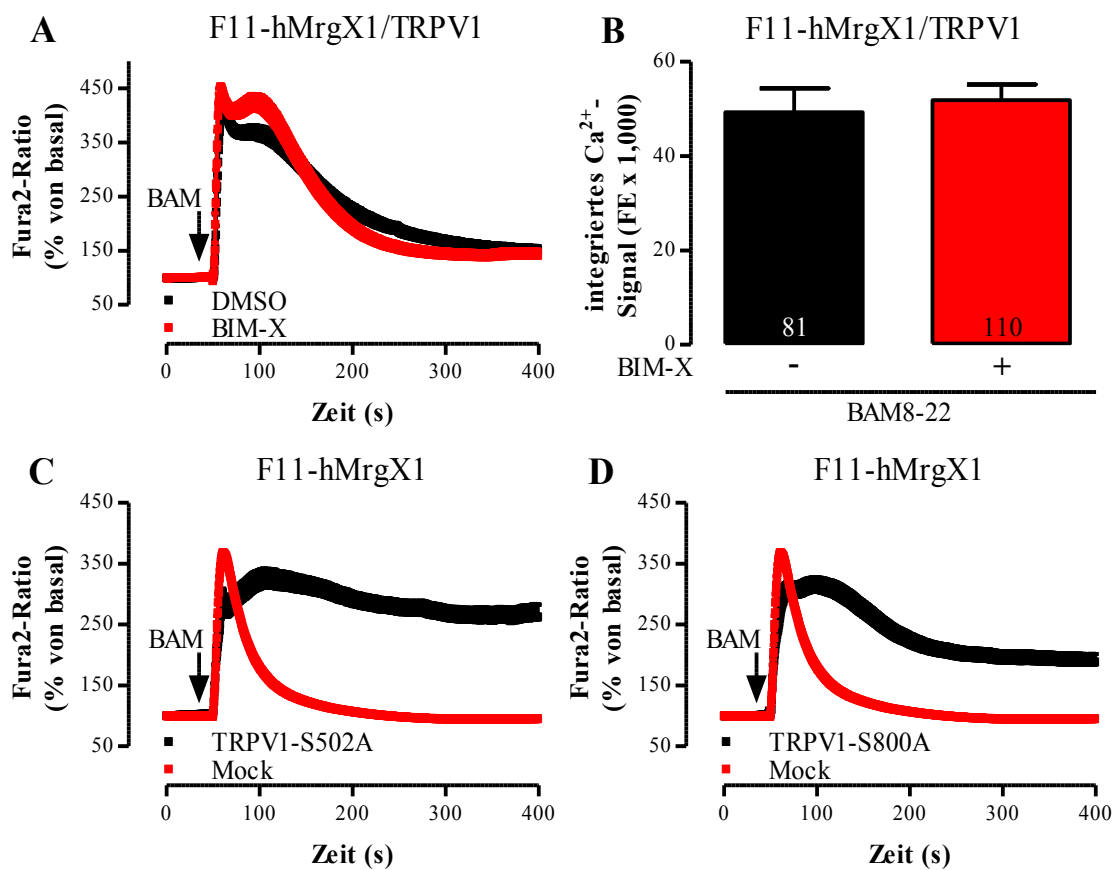


Abbildung 5.31: PKC-unabhängige hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung (Ca^{2+} -Imaging)

(A, C und D) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 (A), der TRPV1-S502A- (C) oder der TRPV1-S800A-Mutante (D) und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μM) injiziert, wobei die Zellen in (A) für 30 Minuten mit DMSO (0,1 %) oder BIM-X (1 μM) vorinkubiert wurden. (B) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen aus (A) wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

5.3.3.3 Messung der direkten TRPV1-Aktivierung mittels Elektrophysiologie

Schließlich sollte die hMrgX1-vermittelte direkte Aktivierung des TRPV1 mit einer Fura2-unabhängigen Methode verifiziert werden, der elektrophysiologischen *Patch Clamp*-Technik (vgl. Abschnitt 4.2.3.8). Im Unterschied zum Ca^{2+} -Imaging oder zum Mn^{2+} -induzierten Fura2-Quenching kann im Rahmen einer elektrophysiologischen Messung durch die geeignete Wahl der intrazellulären Lösung sowie durch ein geeignetes Haltepotential der Beitrag von anderen Ionenkanälen zum gemessenen transmembranären Strom deutlich reduziert werden, so dass eine noch höhere TRPV1-Spezifität erreicht wird. Außerdem ist es durch Anlegen einer Spannungsrampe und gleichzeitige Messung des resultierenden Stroms möglich, spezifische Strom-Spannungsbeziehungen zu erhalten, die ähnlich einem Fingerabdruck einem Ionenkanal zugeordnet werden können.

Während beim Ca^{2+} -Imaging TRPV1-positive bzw. -negative Zellen durch die Messung der YFP-Fluoreszenz getrennt werden konnten, war dies in den elektrophysiologischen Messungen aufgrund des Fehlens einer Fluoreszenzlampe nicht möglich. Daher wurden zunächst einige Etablierungsversuche durchgeführt mit dem Ziel, im gegebenen Zellsystem gemessene Ströme spezifisch dem TRPV1 zuordnen zu können. Dafür wurden F11-hMrgX1-Zellen mit dem pcDNA3.1-TRPV1-YFP-Vektor transfiziert und in der Ganzzellkonfiguration gemessen (vgl. Abschnitt 4.2.3.8). Die Messung wurde bei einem Haltepotential von 0 mV durchgeführt, um spannungsaktivierte Ionenkanäle zu inaktivieren. Ausgehend von diesem Haltepotential wurden dann mit einer Frequenz von 0,5 Hz Spannungsrampen einer Dauer von 50 ms von -100 mV bis +100 mV angelegt und der resultierende Strom aufgezeichnet. Dieser Strom wurde sodann mit Hilfe der totalen Membrankapazität auf die Zellgröße normiert und als Stromdichte gegen die Zeit aufgetragen. Mit Hilfe eines Druckejektionssystems wurde die gerade zu messende Zelle mit einer CAP-haltigen Lösung (5 nM) superfundiert, um TRPV1-vermittelte Ströme zu induzieren.

Es wurden insgesamt 20 Zellen gemessen, von denen sieben Zellen mit einem Einwärts- und Auswärtsstrom auf die Stimulation mit CAP reagierten. Nach einer Einteilung in reagierende und nicht-reagierende Zellen (Abbildung 5.32A) ist eine deutliche Erhöhung der Stromdichte während der Applikation von CAP zu erkennen. Diese Einteilung entspricht auch sehr gut der beobachteten Transfektionseffizienz aus den Ca^{2+} -Imaging-Versuchen, die bei 20 bis 50 % lag. Außerdem zeigte sich in Abbildung 5.32A das bekannte Phänomen der Desensibilisierung des CAP-induzierten Stroms (Caterina, 1997, Yeats, 1992), da die Stromdichte bei der zweiten Applikation von CAP deutlich weniger ansteigt, als bei der ersten Applikation. Zur Quantifizierung des CAP-vermittelten Stroms wurde der basale Strom direkt vor der ersten Applikation vom maximalen CAP-induzierten Strom am Ende der ersten CAP Applikation subtrahiert. Damit ergab sich ein Auswärtsstrom von 127 ± 29 pA und ein Einwärtsstrom von -27 ± 6 pA in den TRPV1-positiven Zellen, während in den Mock-Zellen 1 ± 2 pA bzw. -1 ± 1

Ergebnisse

pA ermittelt wurden (Abbildung 5.32B). Da zusätzlich auch die Strom-Spannungsbeziehung der reagierenden Zellen die TRPV1-typische Auswärtsrektifizierung (Caterina, 1997) zeigte (Abbildung 5.32C), kann es als angemessen angesehen werden, wenn Zellen aufgrund ihres Reaktionsverhaltens in TRPV1-positive bzw. -negative Zellen eingeteilt werden und es kann konstatiert werden, dass in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen deutliche TRPV1-vermittelte Ströme gemessen werden können.

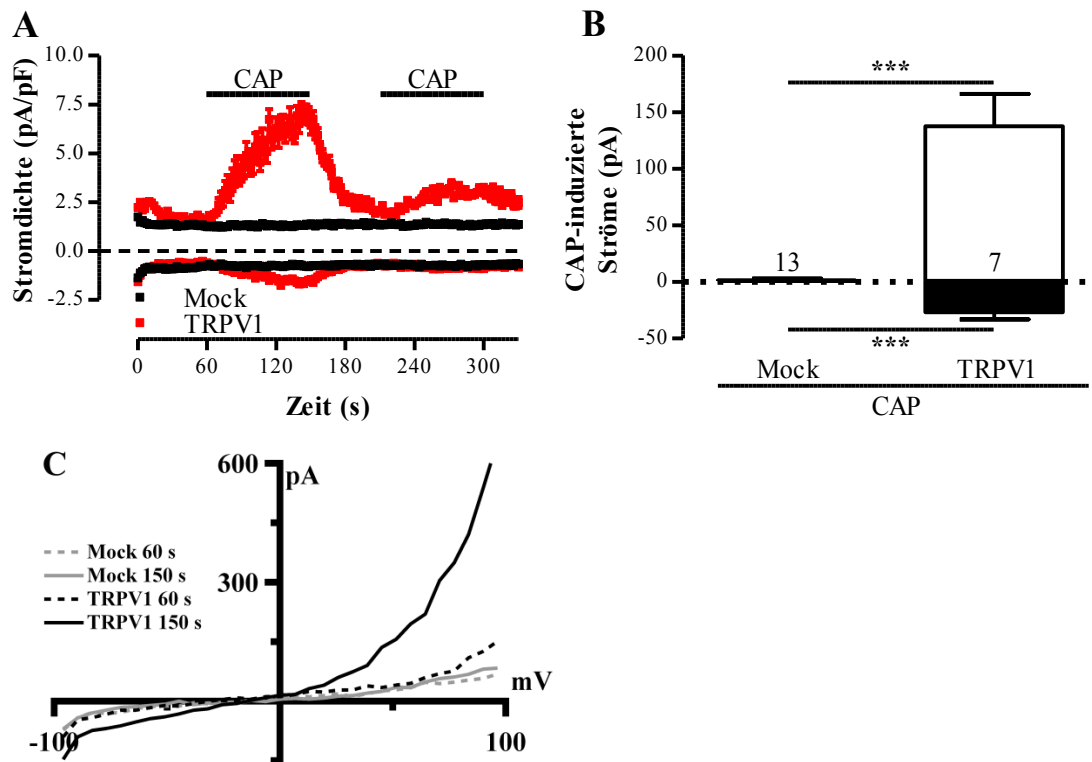


Abbildung 5.32: TRPV1-Ströme in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen nach Stimulation mit CAP

(A) Stromdichte bei ± 60 mV in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1. Die Zellen wurden durch lokale Superfundierung mit CAP (5 nM, schwarzer Balken) stimuliert und in reagierende Zellen (TRPV1) bzw. nicht-reagierende Zellen (Mock) eingeteilt. (B) CAP-induzierte Einwärts- (schwarz) bzw. Auswärtsströme (weiß) bei ± 60 mV wurden durch Subtraktion des basalen Stroms (60 s) vom Strom am Ende der ersten CAP-Applikation (150 s) berechnet und sind als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben. (C) Repräsentative Strom-Spannungsbeziehung je einer TRPV1-positiven und -negativen Zelle vor (60 s) bzw. am Ende (150 s) der ersten CAP-Applikation.

Damit sollte nun zur Stimulation der Zellen eine BAM8-22-haltige Lösung (2 μ M) eingesetzt werden, um zu verifizieren, dass dadurch TRPV1-vermittelte Ströme induziert werden. In der Tat führte die lokale Superfundierung von sechs F11-hMrgX1-Zellen zu einer deutlichen Erhöhung der Stromdichte (Abbildung 5.33A), die nach Ende der BAM8-22-Applikation wieder auf das basale Niveau zurückging und eine Stromgröße von -25 ± 7 pA bzw. 237 ± 58 pA ergab (Abbildung 5.33B). Bei einer gesamten Anzahl von zwölf gemessenen Zellen passt die Verteilung von TRPV1- bzw. Mock-Zellen gut zur beobachteten Transfektionseffizienz. Die Strom-Spannungsbeziehung der BAM8-22-responsiblen Zellen zeigte, ebenso wie nach CAP-Stimulation, die TRPV1-typische

Ergebnisse

Auswärtsrektifizierung (Abbildung 5.33C), so dass auch mit der *Patch Clamp*-Technik ein weiterer, unabhängiger Nachweis der direkten TRPV1-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor gelungen ist. Dieser Nachweis wird weiterhin unterstützt, da die Ko-Stimulation der Zellen mit dem TRPV1-Blocker BCTC zu einer einheitlichen Zellpopulation führte, in der keine der zwölf gemessenen Zellen mit einer erhöhten Stromdichte auf die BAM8-22-Applikation reagierte (Abbildung 5.33A). Dieser Befund stellte sich nach erfolgter Quantifizierung als höchst signifikant heraus (Abbildung 5.33B).

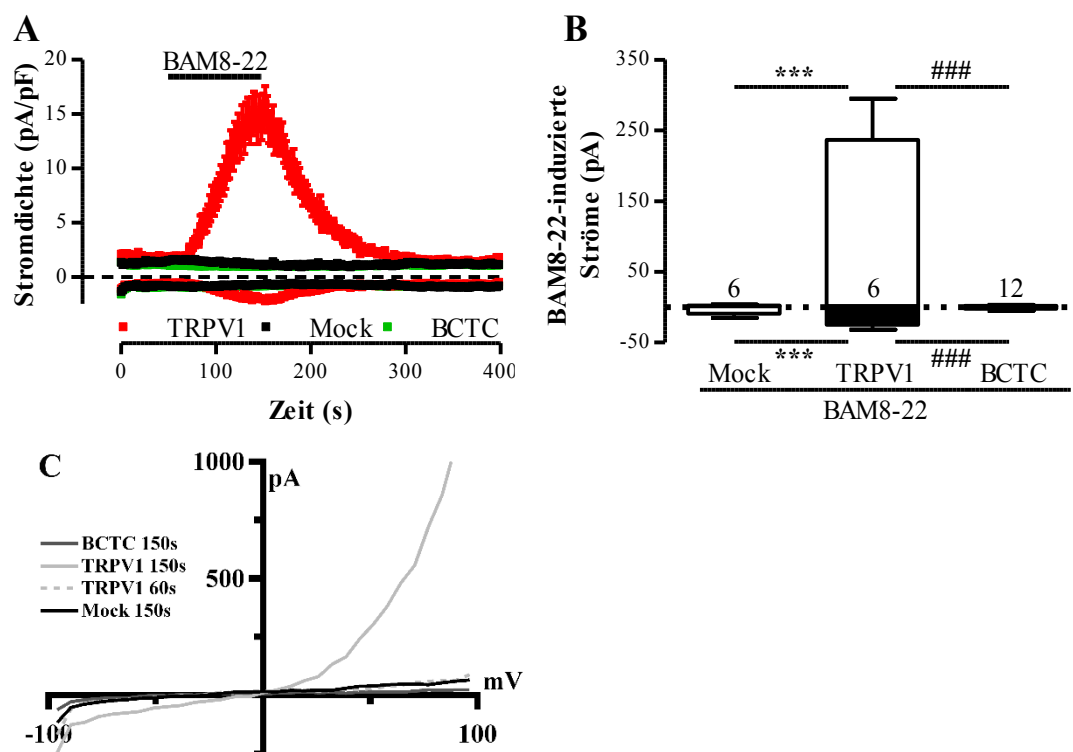


Abbildung 5.33: Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor (Elektrophysiologie)

(A) Stromdichte bei ± 60 mV in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1. Die Zellen wurden durch lokale Superfundierung mit BAM8-22 (2 μ M, schwarzer Balken) stimuliert und in reagierende Zellen (TRPV1) bzw. nicht-reagierende Zellen (Mock) eingeteilt. Bei einigen Zellen war BCTC (500 nM) zusätzlich in der BAM8-22-haltigen Lösung vorhanden. Unter diesen Voraussetzungen verhielten sich alle Zellen gleichförmig, indem sie nicht mehr auf BAM8-22 reagierten und damit nicht in TRPV1- bzw. Mock-Zellen unterteilt werden konnten. (B) BAM8-22-induzierte Einwärts- (schwarz) bzw. Auswärtsströme (weiß) bei ± 60 mV wurden durch Subtraktion des basalen Stroms (60 s) vom Strom am Ende der BAM8-22-Applikation (150 s) berechnet und sind als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben. (C) Repräsentative Strom-Spannungsbeziehung einer TRPV1-positiven Zelle vor (60 s) bzw. am Ende (150 s) und je einer TRPV1-negativen bzw. einer BCTC ko-stimulierten Zelle am Ende (150 s) der BAM8-22-Applikation.

Nachdem auch mit der *Patch Clamp*-Technik eine hMrgX1-induzierte direkte TRPV1-Aktivierung nachgewiesen wurde, sollte auch hier die Frage der PKC-Beteiligung an diesem Signalweg beantwortet werden. Dafür wurden die Zellen für 30 Minuten mit BIM-X oder dem Lösungsmittel DMSO vorinkubiert und anschließend durch Superfundierung einer BAM8-22-haltigen Lösung stimuliert. Die Blockade der PKC hatte keinen signifikant inhibierenden Einfluss auf die Größe der BAM8-22-

induzierten Ströme oder deren Strom-Spannungsbeziehung (Abbildung 5.34). So wurden Stromgrößen von -16 ± 5 pA und 168 ± 53 pA nach DMSO- und -24 ± 9 pA und 148 ± 37 pA nach BIM-X-Behandlung ermittelt. Da außerdem auch kein Einfluss auf den prozentualen Anteil reagierender Zellen genommen wurde (jeweils neun von 20 gemessenen Zellen reagierten), kann somit geschlossen werden, dass die direkte TRPV1-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor bei neutralem pH-Wert und RT, ganz im Gegensatz zur TRPV1-Sensibilisierung, nicht durch die PKC vermittelt wird.

Dieses Ergebnis lässt damit auf distinkte Signalwege, die vom hMrgX1-Rezeptor zur TRPV1-Sensibilisierung bzw. zur TRPV1-Aktivierung führen, schließen. Da die direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor gleichermaßen durch Mn^{2+} -induziertes Fura2-Quenching, TRPV1-abhängige Ströme und verlängerte Ca^{2+} -Signale nachgewiesen werden konnte, wird im Folgenden letztere Technik genutzt, um den zu Grunde liegenden Signalweg aufzuklären.

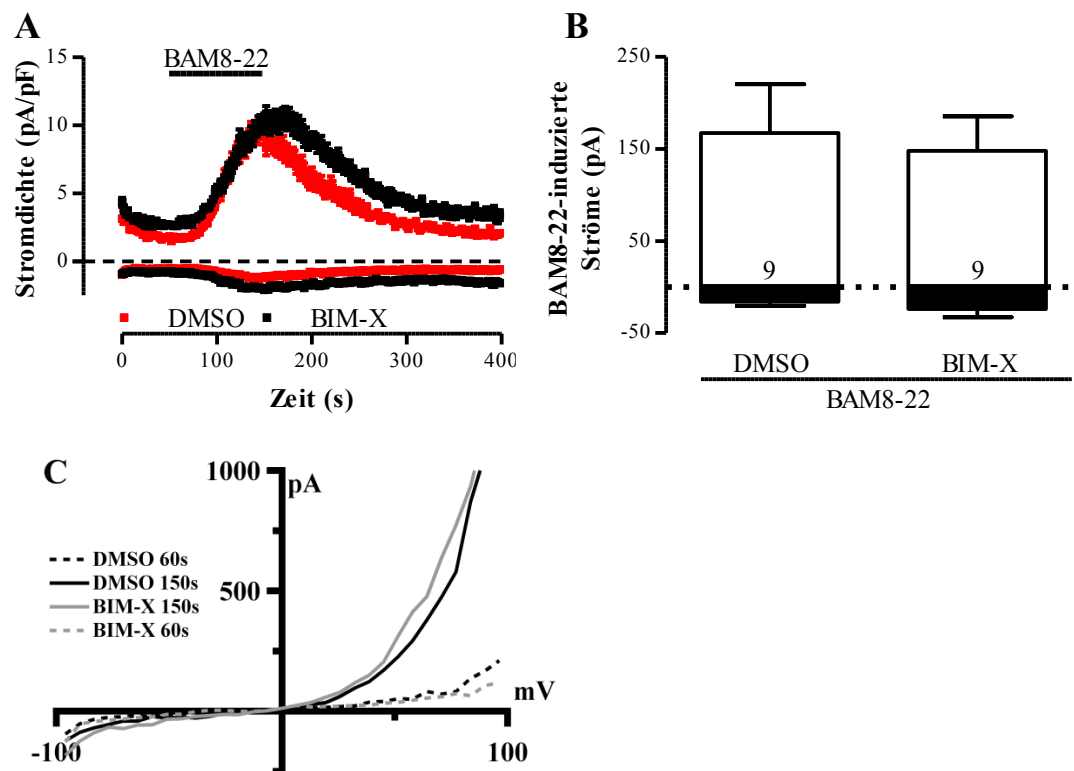


Abbildung 5.34: PKC-unabhängige hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung (Elektrophysiologie)

(A) Stromdichte bei ± 60 mV in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1. Die Zellen wurden durch lokale Superfundierung mit BAM8-22 (2 μ M, schwarzer Balken) stimuliert und entweder mit DMSO (0,1 %) oder BIM-X (1 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert. Es sind nur reagierende Zellen dargestellt. (B) BAM8-22-induzierte Einwärts- (schwarz) bzw. Auswärtsströme (weiß) bei ± 60 mV wurden durch Subtraktion des basalen Stroms (60 s) vom Strom am Ende der BAM8-22-Applikation (150 s) berechnet und sind als Balkendiagramm dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben. (C) Repräsentative Strom-Spannungsbeziehung je einer TRPV1-positiven Zelle vor (60 s) bzw. am Ende (150 s) der BAM8-22-Applikation.

5.3.3.4 Fehlende Beteiligung etablierter TRPV1-modulierender Signalwege an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung

Damit stellte sich die Frage nach PKC-unabhängigen Signalwegen, die der direkten TRPV1-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor zu Grunde liegen könnten. Für den B2R und Histamin-1-Rezeptor (H1R) wurde postuliert, dass die Produktion des endogenen Vanilloids 12-Hydroperoxy-eicosatetraensäure (12-HPETE) durch die Lipoxygenase zur TRPV1-Aktivierung führen kann (Shim, 2007, Shin, 2002). Daher sollte auch für die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung eine Beteiligung von Lipoxygenaseprodukten überprüft werden. In der Studie von Shin wurde dafür der Lipoxygenase-Inhibitor *nordihydroguaiaretic acid* (NDGA) eingesetzt.

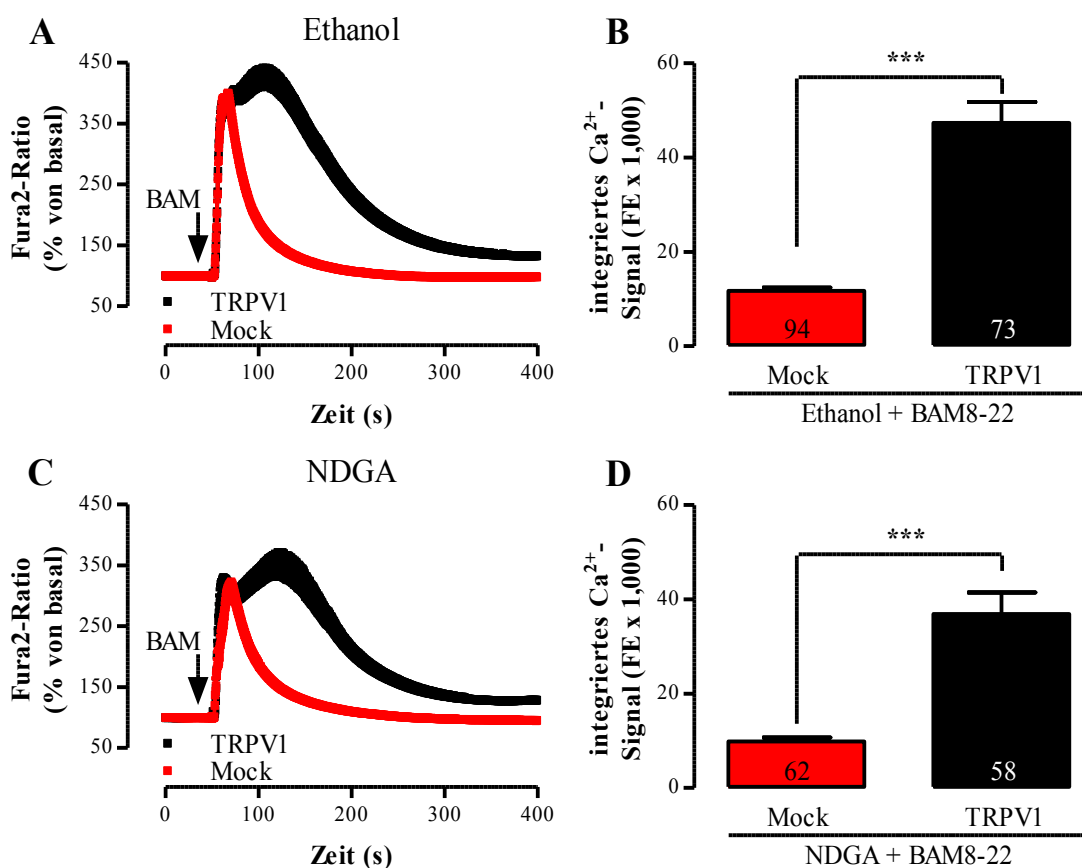


Abbildung 5.35: Lipoxigenase-unabhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung

(A und C) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μM) injiziert. Die Zellen wurden mit Ethanol (A, 0,1 %) oder NDGA (C, 5 μM) für 30 Minuten vorinkubiert, um die Aktivität der Lipoxygenase zu blockieren. (B und D) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Diese Substanz kann nur in Ethanol gelöst werden, so dass F11-hMrgX1-Zellen nachfolgend mit Ethanol oder NDGA für 30 Minuten vorinkubiert wurden. In Abbildung 5.35 ist zu erkennen, dass BAM8-22 unter der Blockade der Lipoxygenase weiterhin den TRPV1 signifikant aktivieren kann. Nach Quantifizierung TRPV1-abhängiger Ca^{2+} -Signale ergab sich nach NDGA-Behandlung ein Ca^{2+} -Signal von 27 ± 5 , während in

Ergebnisse

Ethanol-vorbehandelten Zellen ein Ca^{2+} -Signal von 36 ± 4 ermittelt wurde. Diese Werte differierten nicht signifikant voneinander, so dass davon ausgegangen werden kann, dass die Lipoxygenase-vermittelte 12-HPETE-Produktion nicht an der hMrgX1-abhängigen direkten TRPV1-Aktivierung beteiligt ist.

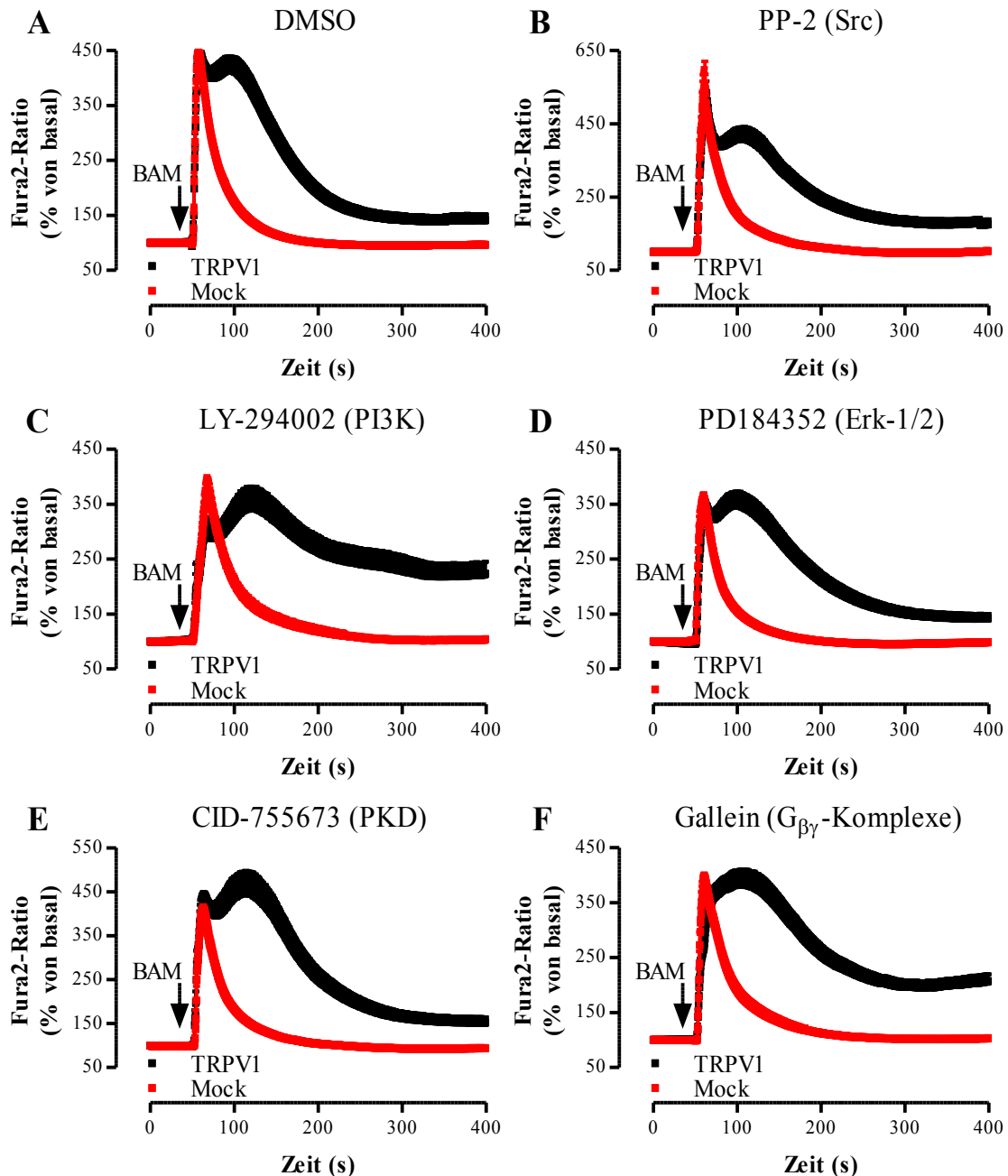


Abbildung 5.36: Src-, PI3K-, Erk-1/2-, PKD- und $\text{G}_{\beta\gamma}$ -unabhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung

(A - F) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μM) injiziert. Die Zellen wurden mit DMSO (A, 0,1 %), PP-2 (B, 10 μM), LY-294002 (C, 10 μM), PD184352 (D, 10 μM), CID-755673 (E, 10 μM) oder Gallein (F, 10 μM) für 30 Minuten vorinkubiert, um die Aktivität der Kinasen Src (B), PI3K (C), Erk-1/2 (D) oder PKD (E) bzw. von $\text{G}_{\beta\gamma}$ -Komplexen (F) zu blockieren. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt und dabei mindestens 27 einzelne Zellen gemessen.

Ergebnisse

Die TrkA-vermittelte Aktivierung der Sarkoma-Kinase (Src) über die Phosphorylierung von Tyrosin 199 des TRPV1-Proteins führt zu dessen Sensibilisierung gegenüber CAP (Zhang, 2005b) und die Aktivierung der Phosphoinositid-3-Kinase (PI3K) zu einem vermehrten TRPV1-Einbau in die Plasmamembran (Stein, 2006). Außerdem wird der TRPV1 über die Erk-1/2-Kinasen durch TNF α sensibilisiert (Hensellek, 2007). Neben diesen drei Kinasen wurde auch die Bedeutung der PKD sowie von G $\beta\gamma$ -Komplexen für die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung untersucht. Es wurden wiederum spezifische Inhibitoren eingesetzt, die die entsprechende Enzymaktivität bzw. eine Protein-Protein-Interaktionsstelle des G $\beta\gamma$ -Komplexes (Lehmann, 2008) blockieren können. Im Falle der Inhibition der Erk-1/2 durch PD184352 wurde nicht direkt die Erk-1/2 gehemmt, sondern es wurde deren Aktivierung durch die Inhibition der vorgeschaltete MKK1 verhindert. Die jeweiligen Inhibitoren oder das Lösungsmittel DMSO wurden für 30 Minuten mit den Zellen inkubiert, bevor Ca²⁺-Imaging-Signale nach Stimulation mit BAM8-22 gemessen wurden. In Abbildung 5.36 bzw. Tabelle 5.3 ist zu erkennen, dass keiner der getesteten Inhibitoren eine signifikante Wirkung auf TRPV1-positive oder -negative Zellen hatte, so dass BAM8-22 immer noch in der Lage war, ein schnelles ER-abhängiges Ca²⁺-Signal zu induzieren und zusätzlich, nur in den TRPV1-positiven Zellen, zu einem Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum zu führen. Damit können die genannten Kinasen bzw. G $\beta\gamma$ -Komplexe nicht an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung beteiligt sein.

Tabelle 5.3: Src, PI3K, Erk-1/2, PKD und G $\beta\gamma$ -Komplexe vermitteln nicht die hMrgX1-induzierte TRPV1-Aktivierung.

Inhibitor	DMSO	PP-2	LY-294002	PD184352	CID-755673	Gallein
Mock	12 \pm 1	16 \pm 1	14 \pm 2	8 \pm 1	11 \pm 1	13 \pm 2
TRPV1	47 \pm 3***	55 \pm 6***	56 \pm 8***	41 \pm 4***	56 \pm 8***	56 \pm 5***

Das integrierte Ca²⁺-Signal einzelner Zellen (dargestellt in Abbildung 5.36) wurde berechnet und ist in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 angegeben. In jeder experimentellen Bedingung wurden signifikant größere Ca²⁺-Signale (angegeben durch ***) in TRPV1-positiven im Vergleich zu TRPV1-negativen Zellen (Mock) gemessen.

5.3.3.5 Bedeutung der PLC- β für die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung

Damit sollte sich im Weiteren der Bedeutung der PLC- β zugewandt werden, da zum einen die hMrgX1-induzierte Aktivierung des G_{q/11}/PLC- β -Weges in der Literatur gut etabliert ist (Burstein, 2006, Lembo, 2002) und zum anderen die Beteiligung von PIP₂ bzw. seiner Spaltprodukte an der Regulation der TRPV1-Aktivität vorgeschlagen wurde (Chuang, 2001, Kim, 2009b, Stein, 2006, Woo, 2008, Lukacs, 2007).

Mit dem PLC- β -Inhibitor U73122 steht ein Molekül zur Verfügung, um die Beteiligung der PLC- β an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung zu untersuchen. Unter der Blockade der PLC- β -Aktivität ist BAM8-22 weder in Mock-Zellen noch in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen in der Lage, Ca²⁺-Signale auszulösen (Abbildung 5.37).

Ergebnisse

Dieser Effekt ist nicht auf eine allgemein toxische Wirkung des U73122 auf die Zellen zurückzuführen, da die basale, zytoplasmatische Ca^{2+} -Konzentration, ein Maß für die Zellvitalität, unverändert blieb. Somit konnte die PLC- β -Abhängigkeit der hMrgX1-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER bestätigt und die unbedingte Notwendigkeit einer aktiven PLC- β für die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung nachgewiesen werden.

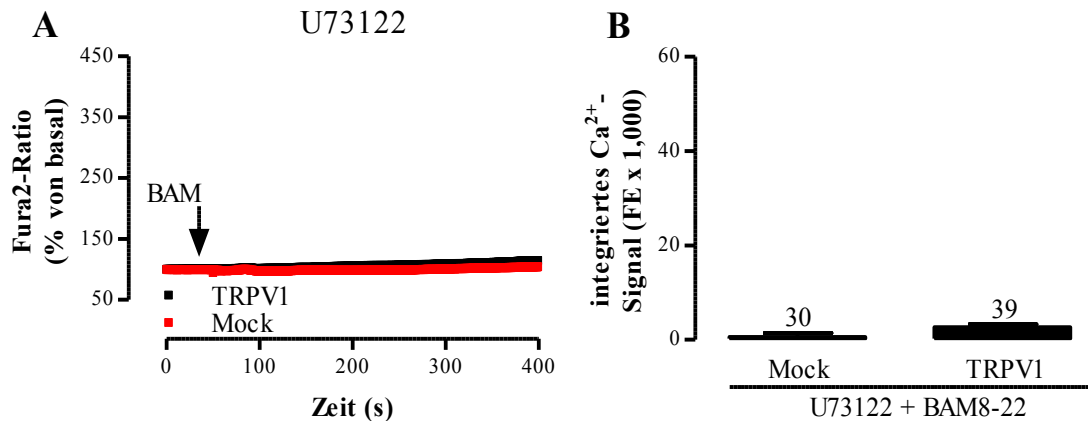


Abbildung 5.37: PLC- β -abhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung

(A) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienster Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μM) injiziert. Die Zellen wurden mit U73122 (10 μM) für 30 Minuten vorinkubiert, um die Aktivität der PLC- β zu blockieren. (B) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Die PLC- β spaltet PIP_2 in DAG und IP_3 , wobei DAG in der Membran verbleibt und IP_3 als hydrophiles Molekül im Zytoplasma frei diffundieren kann. So erreicht es auch ER-ständige IP_3R , welche als Liganden-aktivierte Ca^{2+} -Kanäle zu einer Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER ins Zytoplasma führen (vgl. Abschnitt 3.1.5.3). Dieser Prozess wird von einem hohen elektrochemischen Gradienten für Ca^{2+} -Ionen begünstigt, welcher über ATP-abhängige Ionenpumpen, v. a. die ER-ständige *smooth endoplasmatic reticulum calcium ATPase* (SERCA), aufrechterhalten wird. Die pharmakologische Blockade der SERCA durch den Inhibitor Tapsigargin ermöglicht es, die Befüllung des ER zu verhindern und es damit, bei ständig ablaufendem Export aus dem ER, von Ca^{2+} -Ionen zu entleeren. Damit kann die hMrgX1-vermittelte Aktivierung von Ca^{2+} -abhängigen Signaltransduktionskomponenten blockiert werden, um so Aufschluss zu geben, ob, der PLC- β nachgeschaltet, IP_3 - oder DAG-abhängige Signaltransduktionsprozesse für die TRPV1-Aktivierung zuständig sind. In Vorversuchen wurde durch die Injektion von Tapsigargin während einer Messung zunächst untersucht, wie lange es dauert, bis das ER von Ca^{2+} -Ionen entleert worden ist. Nach 20 bis 25 Minuten war dies erreicht, so dass Zellen vor der Stimulation mit BAM8-22 für 30 Minuten mit Tapsigargin behandelt wurden. In Abbildung 5.38 ist zu erkennen, dass diese Behandlung zur kompletten Blockade der BAM8-22-vermittelten Ca^{2+} -Freisetzung in F11-hMrgX1-Zellen führte, womit das hMrgX1-vermittelte Ca^{2+} -Signal praktisch

ausschließlich der Entleerung intrazellulärer Speicher zugeschrieben werden kann. Interessanterweise konnte BAM8-22 trotz des Fehlens der intrazellulären Komponente des Ca^{2+} -Signals in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen weiterhin den TRPV1 aktivieren, was am Erhalt der zweiten Phase des Ca^{2+} -Signals (26 ± 3) zu erkennen ist. Demnach deutet dieser Befund also auf eine große Bedeutung von DAG-Produktion oder PIP_2 -Degradation hin, um die Effekte der PLC- β -Inhibition (vgl. Abbildung 5.37) auf die hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung erklären zu können. Weiterhin macht dieses Experiment die Beteiligung von Ca^{2+} -aktivierten Proteinen, beispielsweise der Calmodulin-abhängigen-Kinase 2, für die beispielsweise auch eine Modulation der TRPV1-Aktivität diskutiert wird (Jung, 2004), an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung äußerst unwahrscheinlich.

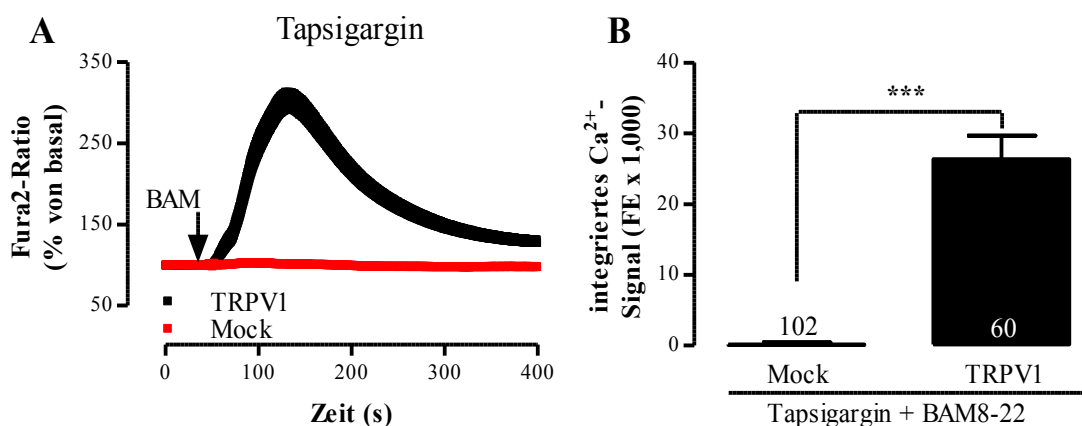


Abbildung 5.38: Ca^{2+} -unabhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung

(A) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μM) injiziert. Die Zellen wurden mit Tapsigargin (1 μM) für 30 Minuten vorinkubiert, um die Aktivität der SERCA zu blockieren. (B) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

5.3.3.6 Aktivierung des TRPV1 durch direkte DAG-Bindung in F11-hMrgX1-Zellen

Die Beteiligung von DAG an der TRPV1-Aktivierung wird kontrovers diskutiert und könnte möglicherweise vom jeweiligen zellulären System abhängen (Hofmann, 1999, Woo, 2008). Daher sollte im Rahmen dieser Arbeit zunächst geklärt werden, ob der TRPV1 in F11-hMrgX1-Zellen durch DAG aktiviert wird. Zunächst wurden F11-hMrgX1-Zellen nach Expression des TRPV1 mit dem zellpermeablen DAG-Analog Oleoyl-acetyl-glycerol (OAG) stimuliert. In Abbildung 5.39A und B ist zu erkennen, dass die Injektion von OAG zu einem deutlichen Ca^{2+} -Signal von 20 ± 4 in TRPV1-positiven Zellen führte, während in TRPV1-negativen Zellen keine Veränderung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration zu messen war.

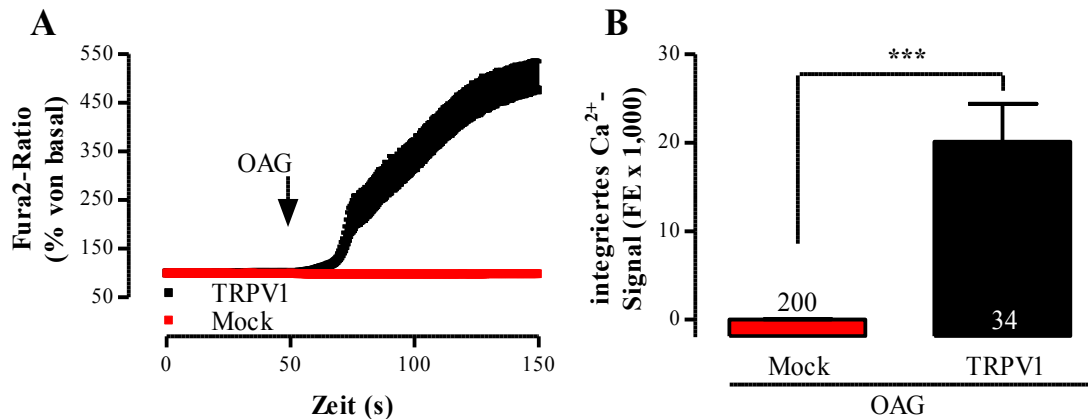


Abbildung 5.39: OAG-induzierte Ca²⁺-Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen

(A) Ca²⁺-Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transients Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde OAG (100 μ M) injiziert. (B) Das integrierte Ca²⁺-Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Dieser interessante Befund könnte, neueren Befunden folgend (Woo, 2008), auf eine OAG-vermittelte Aktivierung des TRPV1 hindeuten. Allerdings sind bzgl. des zu Grunde liegenden Signalweges prinzipiell zwei Erklärungen denkbar. Zum einen die direkte Bindung an das TRPV1-Protein (Woo, 2008) oder zum anderen die OAG-vermittelte Aktivierung der PKC und nachfolgende Phosphorylierung des TRPV1, was in einigen Studien beobachtet, aber auch von anderen widerlegt worden ist (Bhave, 2003, Premkumar, 2000, Vellani, 2001). In dieser Arbeit führte eine Stimulation von TRPV1-positiven F11-hMrgX1-Zellen mit dem PKC-Aktivator Phorbol-myristyl-acetat (PMA) zu einem deutlichen, wenn auch, im Vergleich mit OAG, weniger starken Ca²⁺-Signal (Abbildung 5.40A und B). Diese PMA-vermittelte TRPV1-Aktivierung konnte vollständig auf eine PKC-Aktivierung zurückgeführt werden, da sie durch die vorherige Inkubation mit dem PKC-Inhibitor BIM-X komplett blockiert werden konnte (Abbildung 5.40C und D). Somit scheint eine PKC-vermittelte TRPV1-Aktivierung in F11-hMrgX1-Zellen möglich und könnte damit als Erklärung für die OAG-vermittelten Ca²⁺-Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen genutzt werden. Durch die vorherige Behandlung von F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen mit dem PKC-Inhibitor BIM-X wurde daher geprüft, wie die OAG-induzierten Ca²⁺-Signale zu erklären sind. Es zeigte sich eine partielle Inhibition (Abbildung 5.40E und F) der OAG-vermittelten TRPV1-Aktivierung, womit die OAG-vermittelte TRPV1-Aktivierung durch eine PKC-abhängige Phosphorylierung (~52 %) und zusätzlich durch die direkte Bindung an den TRPV1 (~48 %) erklärbar wäre.

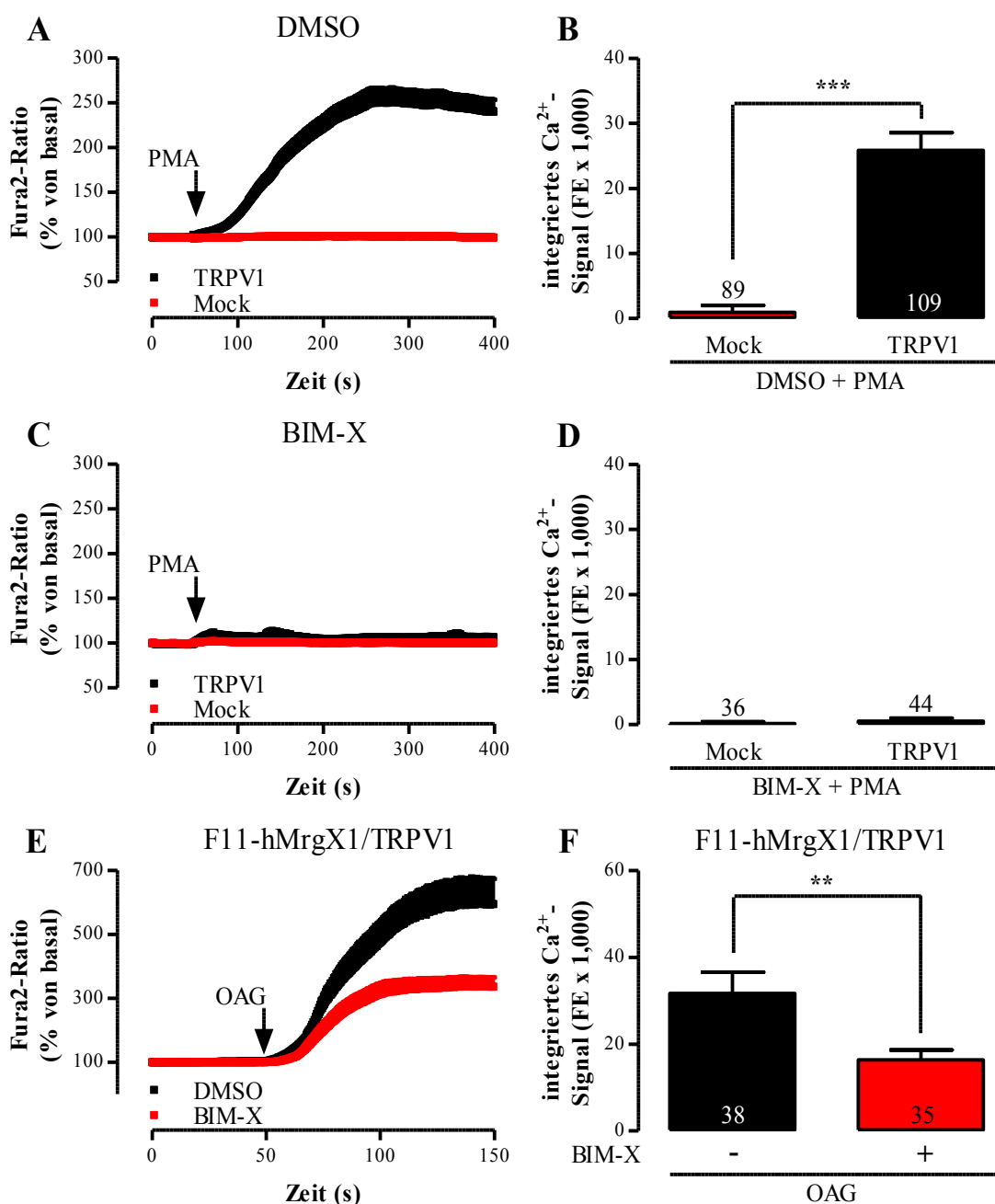


Abbildung 5.40: PMA- und OAG-induzierte Ca^{2+} -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen

(A, C und E) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde PMA (A und C, 1,5 μM) oder OAG (E, 100 μM) injiziert. Die Zellen wurden mit BIM-X (C und E, 1 μM) oder DMSO (A und C, 0,1 %) für 30 Minuten vorinkubiert. (B, D und F) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Um schließlich zu klären, ob der TRPV1 in F11-hMrgX1-Zellen durch endogenes DAG aktiviert werden kann, wurde sich die basale Enzymaktivität der PLC- β , durch die ständig DAG aus PIP_2 gebildet wird, zu Nutze gemacht. Indem das DAG-abbauende Enzym, DAG-Kinase, durch einen Inhibitor gehemmt wurde, war es möglich, endogen-produziertes DAG in der Zelle zu akkumulieren. In Abbildung 5.41 ist deutlich zu sehen, dass dieses Vorgehen nur in den Zellen zu einem langsamen, aber andauernden Ca^{2+} -Signal führte, in denen der TRPV1 exprimiert wurde. Da dieses Experiment nach

Ergebnisse

Vorbehandlung mit dem PKC-Inhibitor BIM-X durchgeführt und damit eine Beteiligung der PKC am DAG-vermittelten Effekt ausgeschlossen wurde, ist zu postulieren, dass die TRPV1-Aktivierung in F11-hMrgX1-Zellen durch eine direkte Bindung von DAG an das TRPV1-Protein ausgelöst wurde.

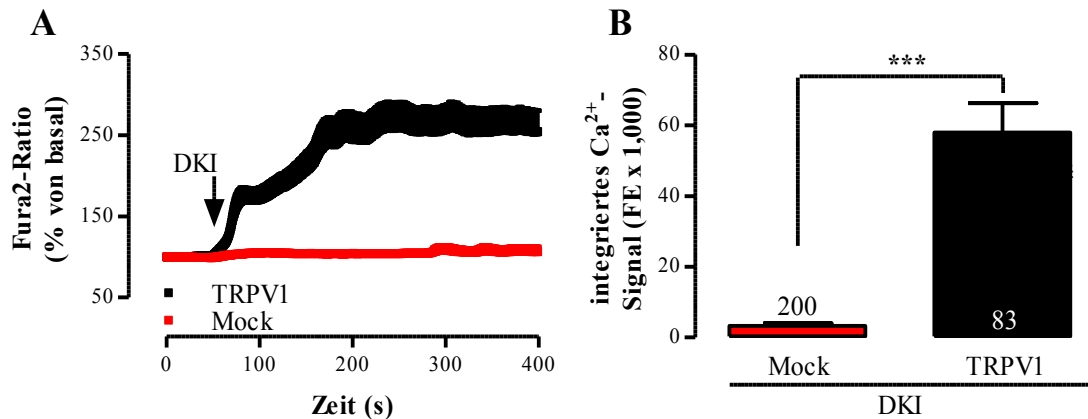


Abbildung 5.41: DAG-Akkumulation-induzierte Ca²⁺-Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen
 (A) Ca²⁺-Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde der DAG-Kinase-Inhibitor 2 (DKI, 10 μ M) injiziert. Die Zellen wurden zur Blockade der PKC-Aktivität mit BIM-X (1 μ M) für 30 Minuten vorinkubiert. (B) Das integrierte Ca²⁺-Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Eine solche direkte Bindung kann durch die Identifizierung einer bindungsdefizienten Mutante nachgewiesen werden. Woo schlägt die besondere Bedeutung von Tyrosin 511 für die DAG-Bindung an den TRPV1 vor (Woo, 2008). Daher wurde durch molekularbiologische Techniken (vgl. Abschnitt 4.1.8.2) eine TRPV1-Mutante generiert, bei der Tyrosin 511 zu Alanin ausgetauscht wurde.

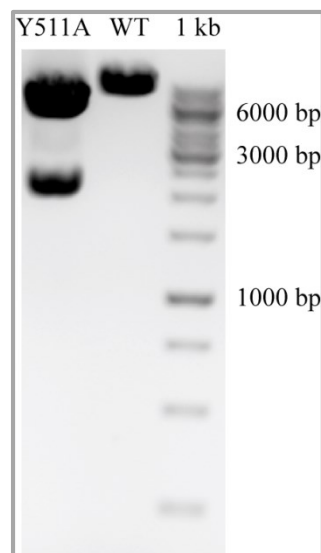


Abbildung 5.42: Restriktionsanalyse des pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-YFP-Vektors
 Ethidiumbromid-Fluoreszenz nach gleichzeitigem Restriktionsverdau von je 1 μ g pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-YFP (Y511A) und pcDNA3.1-TRPV1-YFP (WT) mit den Enzymen AfeI und MluI. Als Referenz für die Größe der resultierenden Fragmente wurde ein 1 kb Größenstandard (einige Fragmente sind angegeben) eingesetzt.

Bei diesem Austausch wurde die Restriktionsschnittstelle des Enzyms AfeI neu in die DNA-Sequenz des TRPV1 eingebracht. Der gleichzeitige Verdau der TRPV1-DNA mit den Restriktionsenzymen AfeI und MluI sollte somit nur zu einer Linearisierung des pcDNA3.1-TRPV1-YFP-Vektors führen, während bei einem gleichförmigen Verdau der potentiellen TRPV1-Y511A-Mutante, aufgrund der zusätzlich vorhandenen AfeI-Schnittstelle, zwei kürzere Fragmente entstehen sollten. Nach einer solchen Restriktionsanalyse zeigten sich ein bzw. zwei DNA-Fragmente der erwarteten Größe (Abbildung 5.42). Nachfolgend wurde die ansonsten fehlerfreie Identität des pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-YFP-Vektors durch DNA-Sequenzierung verifiziert.

Nachdem diese TRPV1-Mutante auf DNA-Ebene verifiziert werden konnte, wurde nun geprüft, ob durch das Fehlen der putativen DAG-Bindungsstelle die TRPV1-Aktivierung durch OAG kompromittiert wurde. In Abbildung 5.43A und B ist zu erkennen, dass die Mutation von Tyrosin 511 zu Alanin zu einem praktisch vollständigen Fehlen der TRPV1 Aktivierung durch OAG führte. Um Effekte durch eine OAG-induzierte PKC-Phosphorylierung auszuschließen, wurde auch in diesem Experiment mit BIM-X vor behandelt.

Der gegebene Befund ist außer durch die Beteiligung von Tyrosin 511 an der DAG-Bindung auch durch Effekte auf die Faltung des TRPV1-Proteins oder auf dessen Transport an die Zellmembran zu erklären. Daher wurde die TRPV1-Y511A-Mutante im Vergleich zum WT mit den Agonisten CAP oder Protonen stimuliert. Interessanterweise fehlte die CAP-induzierte Aktivierung der Y511A-Mutante vollständig, während die Protonen-vermittelte TRPV1-Aktivierung nicht verändert wurde (Abbildung 5.43C bis F). Dieser Effekt stimmt mit der Literatur überein, da Tyrosin 511 an der Bindung von CAP beteiligt ist, indem eine hydrophobe Wechselwirkung mit dem aliphatischen Rest des Vanilloids ausgeübt wird (Gavva, 2004, Jordt, 2002). Der fehlende Einfluss auf die Protonen-induzierte TRPV1-Aktivierung (Abbildung 5.43E und F) stimmt ebenso mit der Literatur überein (Jordt, 2002) und etabliert zusätzlich die funktionelle Expression der TRPV1-Y511A-Mutante an der Zellmembran, da die Bindestelle für die membranimpermeablen Protonen im Bereich der zweiten extrazellulären Schleife des TRPV1-Proteins zu finden ist (Ryu, 2007). Damit konnte mittels der TRPV1-Y511A-Mutante die DAG/OAG-vermittelte Aktivierung des TRPV1 durch direkte Bindung in F11-hMrgX1-Zellen bestätigt werden und es wurde ein molekulares Werkzeug generiert, mit dem die Bedeutung der hMrgX1-vermittelten DAG-Produktion für die direkte TRPV1-Aktivierung untersucht werden konnte.

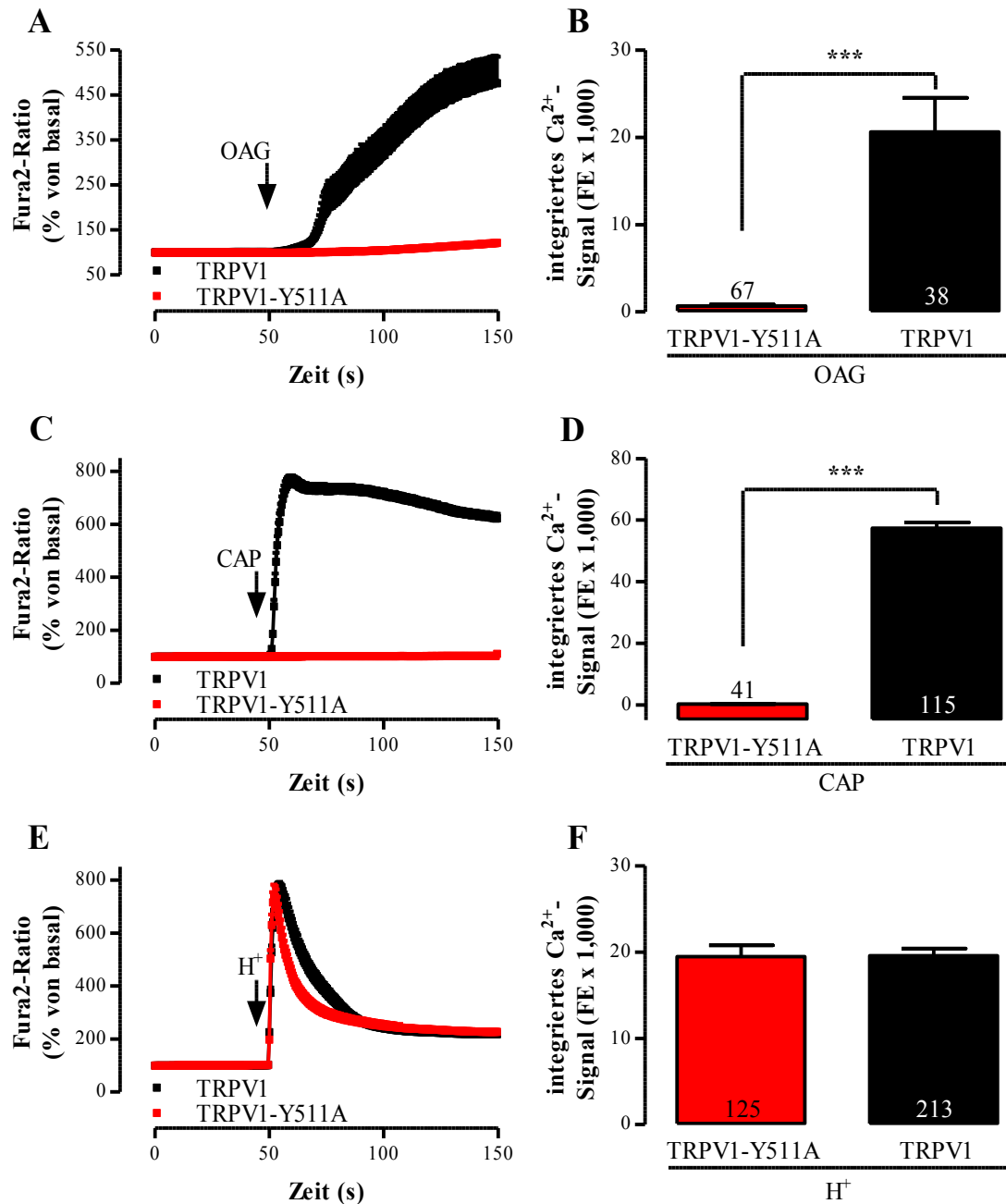


Abbildung 5.43: DAG-vermittelte TRPV1-Aktivierung über die CAP-Bindestelle Tyrosin 511
(A, C und E) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 oder der TRPV1-Y511A-Mutante und Beladung mit Fura2-AM. Es wurden OAG (A, 100 μM), CAP (C, 10 nM) oder Protonen (E, pH 6,2) injiziert. In (A) wurden die Zellen zur Blockade der PKC-Aktivität mit BIM-X (1 μM) für 30 Minuten vorinkubiert. (B, D und F) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

5.3.3.7 TRPV1-Aktivierung durch hMrgX1-Rezeptoren über DAG-Produktion

Das neu generierte molekulare Werkzeug nutzend wurden F11-hMrgX1-Zellen mit dem TRPV1 oder der TRPV1-Y511A-Mutante transfiziert und danach mit BAM8-22 stimuliert. In Abbildung 5.44 ist zu erkennen, dass das Fehlen der DAG-Bindestelle im TRPV1-Protein zu einer dramatischen Reduktion der hMrgX1-vermittelten TRPV1-

Ergebnisse

Aktivierung von 45 ± 2 auf 13 ± 2 führte. Dies entspricht einer Abnahme von $\sim 71\%$. Damit nimmt die hMrgX1-vermittelte PLC- β -abhängige DAG-Produktion eine bedeutende Rolle bei der direkten TRPV1-Aktivierung bei RT und neutralem pH-Wert ein. Dieser Signalweg ist bereits für den M1-Acetylcholinrezeptor (M1R) und den metabotropen Glutamatrezeptor 5 (mGluR5) postuliert worden (Kim, 2009b, Woo, 2008) und könnte daher eine wichtige Signaltransduktionskaskade für $G_{q/11}$ -aktivierende GPCR im Allgemeinen darstellen. Allerdings ist zu konstatieren, dass im Gegensatz zu den gerade zitierten Studien eine signifikant messbare Aktivierung der TRPV1-Y511A-Mutante durch die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors zu verzeichnen ist. Damit müssen außer DAG weitere Signaltransduktionskomponenten an der TRPV1-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor beteiligt sein.

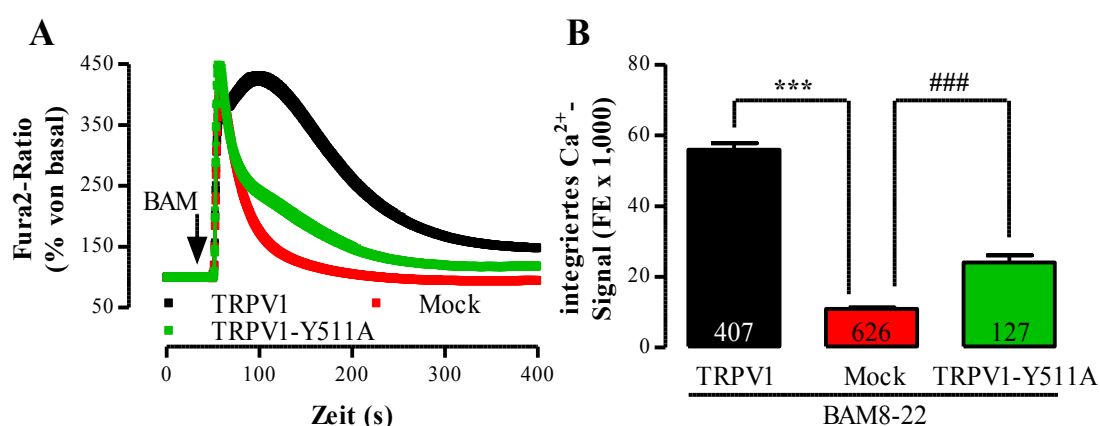


Abbildung 5.44: Aktivierung der TRPV1-Y511A-Mutante durch den hMrgX1-Rezeptor

(A) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transients Expression des TRPV1 oder der TRPV1-Y511A-Mutante und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μ M) injiziert. (B) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) \times 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

5.3.3.8 TRPV1-Aktivierung durch hMrgX1-Rezeptoren über PIP₂-Abbau

Aufgrund der vollständigen Blockade der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch den PLC- β -Inhibitor U73122 (vgl. Abbildung 5.37) und der Unabhängigkeit dieser Aktivierung von der IP₃-induzierten Ca^{2+} -Freisetzung aus dem ER (vgl. Abbildung 5.38) könnte postuliert werden, dass zusätzlich zur DAG-Produktion der Abbau von PIP₂ eine wichtige molekulare Determinante für die TRPV1-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor darstellt. Diese Vermutung wird durch andere Arbeiten vorgeschlagen, aber jedoch ebenso bezweifelt (Chuang, 2001, Lukacs, 2007, Stein, 2006). Dabei wurde im C-terminalen Bereich des TRPV1-Proteins eine putative PIP₂-Bindungsstelle beschrieben, die für eine basale Inhibition der TRPV1-Aktivität sorgt (Prescott, 2003). Dieser Arbeit folgend wurde eine TRPV1-Mutante generiert (vgl. Abschnitt 4.1.8.2), bei der die putative PIP₂-Bindestelle im C-terminalen Bereich des Proteins deletiert worden ist. Der genaue PIP₂-bindende Bereich des TRPV1 wurde zwischen Aminosäure 776 und 821 identifiziert (Prescott, 2003), so dass in der hier genutzten Deletionsmutante TRPV1-

Ergebnisse

Δ777-820-YFP die Aminosäuren 777 bis 820 fehlen. Durch das Fehlen der kodierenden DNA-Sequenz für diese Aminosäuren sinkt die Anzahl der Schnittstellen des Restriktionsenzym *Xho*I im gesamten Plasmid von zwei auf eins. Genau dieser Phänotyp konnte ermittelt werden, da beim Verdau des WT-TRPV1 zwei Restriktionsbanden entstanden, die Deletionsmutante aber nur linearisiert wurde (Abbildung 5.45). Schließlich wurde durch DNA-Sequenzierung die komplette Identität der TRPV1-Δ777-820-YFP-Mutante verifiziert.

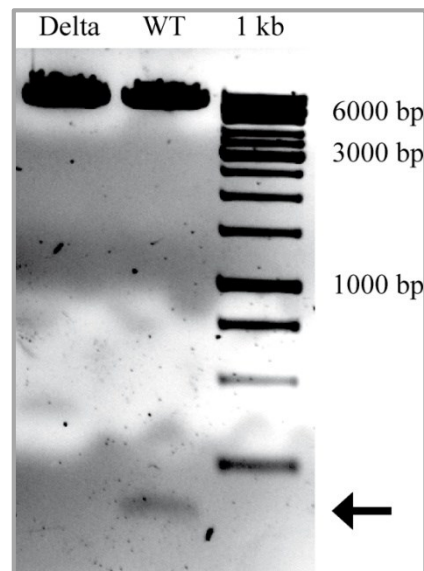


Abbildung 5.45: Restriktionsanalyse des pcDNA3.1-TRPV1-Δ777-820-YFP-Vektors

Ethidiumbromid-Fluoreszenz nach Restriktionsverdau von je 1 µg pcDNA3.1-TRPV1-Δ777-820-YFP (Delta) und pcDNA3.1-TRPV1-YFP (WT) mit dem Enzym *Xho*I. Eine zusätzliche Restriktionsbande des WT ist mit einem Pfeil markiert. Als Referenz für die Größe der resultierenden Fragmente wurde ein 1 kb Größenstandard (einige Fragmente sind angegeben) eingesetzt.

Nach der Verifizierung auf DNA-Ebene sollte nun zunächst überprüft werden, ob die Deletionsmutante die Proteinfaltungskontrolle des ER ordentlich durchläuft und die Zellmembran erreicht. Daher wurden die Expressionskonstrukte für das TRPV1-YFP- bzw. TRPV1-Δ777-820-YFP-Fusionsprotein in F11-hMrgX1-Zellen transfiziert und Ca^{2+} -Signale nach Stimulation mit CAP gemessen. In Abbildung 5.46A und B ist zu erkennen, dass das Deletionskonstrukt deutlich durch CAP aktiviert wird (63 ± 3), möglicherweise sogar etwas besser, als der WT (57 ± 2). Dieser Befund deutet auf eine ähnliche funktionelle Proteinexpression der TRPV1-Deletionsmutante auf der Zellmembran hin. Prescott beschreibt eine basale Inhibition des TRPV1 durch PIP_2 , die sich in einer höheren basalen Aktivität der Deletionsmutante äußert (Prescott, 2003). Um zu überprüfen, ob sich dieser Befund auch in F11-hMrgX1-Zellen zeigt, wurde von den, in Abbildung 5.46A gezeigten, Zellen die Fura2-Ratio der ersten 5 Sekunden der Messung bestimmt, ohne, wie sonst üblich, auf den ersten gemessenen Wert zu normieren. Aus dieser Berechnung resultierte ein einheitenloser Zahlenwert. Dieser Wert steigt mit einer höheren basalen zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration an, was auf eine erhöhte basale TRPV1-Aktivität zurückgeführt werden könnte. In der Tat ergab sich nach Expression der

Ergebnisse

Deletionsmutante eine erhöhte basale Fura2-Ratio (584 ± 1 gegenüber 559 ± 1), was hier, dem Modell von Prescott folgend, als erhöhte basale Kanalaktivität aufgrund der fehlenden inhibitorischen PIP₂-Bindestelle aufgefasst wird (Abbildung 5.46C). Dieser Befund kann nicht durch ein allgemein höheres Expressionsniveau der Deletionsmutante erklärt werden, da die Fluoreszenz der YFP-Fusionsproteine zwischen der Deletionsmutante und dem WT nicht differiert (Abbildung 5.46D). Damit konnte die TRPV1- $\delta 777$ -820-YFP-Mutante auch auf Proteinebene verifiziert werden, insbesondere konnte auch die fehlende basale Inhibition dargestellt werden.

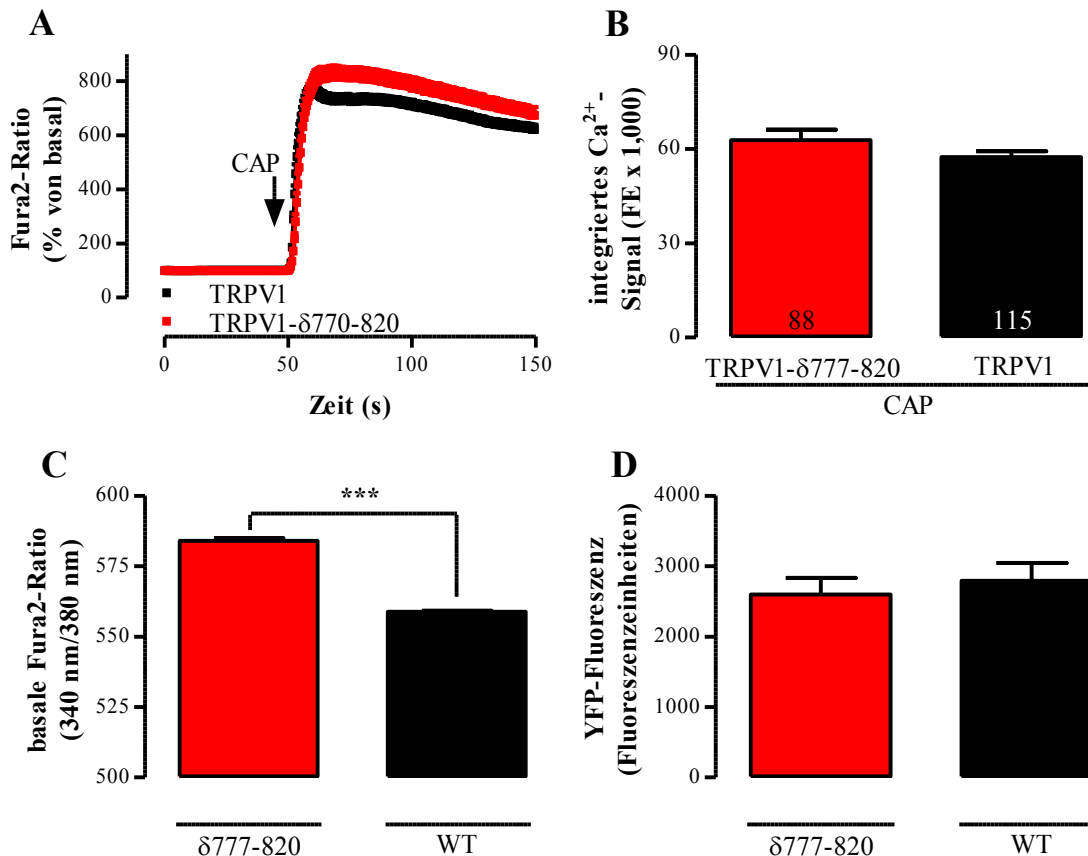


Abbildung 5.46: CAP-induzierte und basale Aktivierung der TRPV1- $\delta 777$ -820-Mutante

(A) Ca²⁺-Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transients Expression des TRPV1 oder der TRPV1- $\delta 777$ -820-Mutante und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde CAP (10 nM) injiziert. (B) Das integrierte Ca²⁺-Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben. (C) Die basale Fura2-Ratio der ersten 5 Sekunden aus (A) ist ohne Normierung als Balkendiagramm dargestellt. (D) Die YFP-Fluoreszenz der jeweiligen TRPV1-Fusionsproteine ist als Balkendiagramm aufgetragen.

Nachfolgend war es möglich zu überprüfen, ob der PLC- β -abhängige PIP₂-Abbau an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung beteiligt ist. Dazu wurden Ca²⁺-Signale nach Stimulation mit BAM8-22 zwischen F11-hMrgX1- und TRPV1- oder TRPV1- $\delta 777$ -820-ko-exprimierenden F11-Zellen verglichen. Aus den Ergebnissen in Abbildung 5.47 ist ersichtlich, dass die TRPV1- $\delta 777$ -820-Mutante (25 ± 2) durch BAM8-22 im Vergleich mit dem WT (45 ± 2) deutlich schlechter aktiviert wird, nämlich um ~43 %. Dieser Befund kann damit erklärt werden, dass der inhibitorischen Einfluss des PIP₂ auf die

Deletionsmutante schon unter basalen Bedingungen fehlt und es damit im Unterschied zum WT nicht zu einer hMrgX1-vermittelten Disinhibition durch eine PLC- β -Aktivierung kommt. Trotz einer Beteiligung des PIP₂-Abbaus an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung wird auch die TRPV1- δ 777-820-Mutante, wie übrigens die TRPV1-Y511A-Mutante auch (vgl. Abbildung 5.44), signifikant durch den hMrgX1-Rezeptor aktiviert.

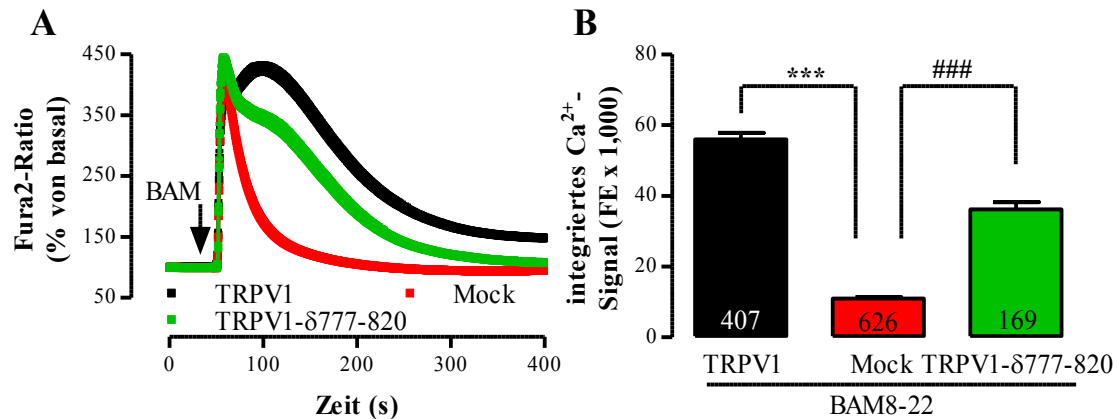


Abbildung 5.47: Aktivierung der TRPV1- δ 777-820-Mutante durch den hMrgX1-Rezeptor
 (A) Ca²⁺-Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 oder der TRPV1- δ 777-820-Mutante und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μ M) injiziert. (B) Das integrierte Ca²⁺-Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

5.3.3.9 TRPV1-Aktivierung durch hMrgX1-Rezeptoren über DAG-Produktion und PIP₂-Abbau

Durch die Generierung von TRPV1-Mutanten, denen die Bindestelle für CAP bzw. DAG oder die Bindestelle für PIP₂ fehlt, konnten zwei Signalwege auf molekularer Ebene identifiziert werden, welche für die direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor verantwortlich sind. Sowohl die TRPV1-Y511A- als auch die TRPV1- δ 777-820-Mutante wurden allerdings durch den hMrgX1-Rezeptor noch signifikant aktiviert, so dass nachfolgend untersucht werden sollte, ob die DAG-Produktion und der PIP₂-Abbau ausreichen, um die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung vollständig zu erklären. Dafür wurde eine TRPV1-Mutante generiert, der sowohl die DAG- als auch die PIP₂-Bindestelle fehlt. Ausgehend von der Deletionsmutante wurde dafür wiederum Tyrosin 511 gegen Alanin ausgetauscht (vgl. Abschnitt 4.1.8.2). Zur Verifizierung des Konstruktes auf DNA-Ebene erfolgte daher erstens ein Restriktionsverdau mit den beiden Restriktionsenzymen AfeI und MluI, bei dem zwei Fragmente ähnlicher Größe wie bei der TRPV1-Y511A-Mutante entstanden (Abbildung 5.48), sowie zweitens die Sequenzierung der kompletten kodierenden Sequenz.

Ergebnisse

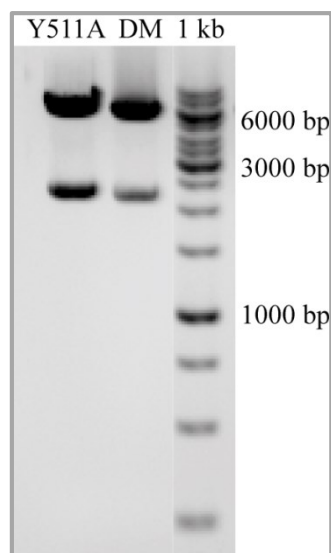


Abbildung 5.48: Restriktionsanalyse des pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-δ777-820-YFP-Vektors

Ethidiumbromid-Fluoreszenz nach gleichzeitigem Restriktionsverdau von je 1 µg pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-YFP (Y511A) und pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-δ777-820-YFP (DM) mit den Enzymen AfeI und MluI. Als Referenz für die Größe der resultierenden Fragmente wurde ein 1 kb Größenstandard (einige Fragmente sind angegeben) eingesetzt.

Zusätzlich sollte die erfolgreiche Faltung sowie ein korrekter Membrantransport des doppelt mutierten TRPV1-Proteins untersucht werden. Dafür wurden F11-hMrgX1-Zellen mit dem TRPV1 oder der neu generierten Doppelmutante TRPV1-Y511A-δ777-820 transfiziert und mit Protonen stimuliert, da durch die Y511A-Mutation die CAP-Bindestelle mutiert worden ist (vgl. Abbildung 5.43). In Abbildung 5.49 ist zu erkennen, dass die Doppelmutante durch Protonen deutlich aktiviert wird.

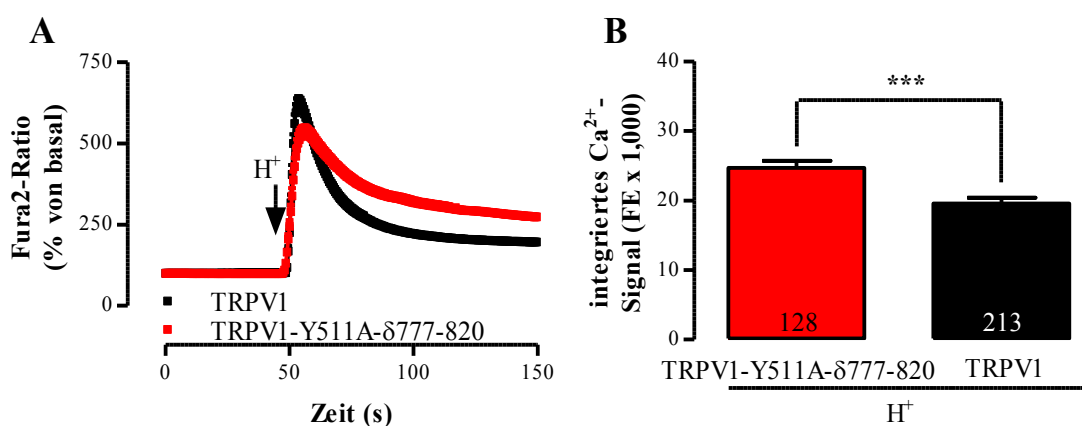


Abbildung 5.49: CAP-induzierte Ca^{2+} -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Y511A-δ777-820-Zellen

(A) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 oder der TRPV1-Y511A-δ777-820-Mutante und Beladung mit Fura2-AM. Es wurden Protonen (pH 6,2) injiziert. (B) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Im Vergleich mit dem TRPV1 fällt auf, dass der initiale Ca^{2+} -Einstrom etwas geringer ausfällt, dafür das Signal aber langsamer abfällt, was zusammen in einer signifikanten Erhöhung des Ca^{2+} -Signal von 20 ± 1 auf 25 ± 1 resultierte. Dies könnte

möglicherweise in dem Fehlen der PIP₂-Bindestelle, über welche laut Lukacs ein Teil der Desensibilisierung des Kanals abläuft (Lukacs, 2007), begründet sein. Trotzdem kann von einer ähnlich guten posttranslationalen Prozessierung mit nachfolgendem Transport der TRPV1-Y511A- δ 777-820-Mutante an die Zellmembran ausgegangen werden. Damit ist auch dieses dritte molekulare Werkzeug auf DNA- und Proteinebene verifiziert worden und steht somit für die Analyse der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung zur Verfügung.

Daher wurden, wiederum im Vergleich mit dem TRPV1, Ca²⁺-Signale nach Stimulation mit BAM8-22 analysiert (Abbildung 5.50). Es wird sofort ersichtlich, dass die TRPV1-Y511A- δ 777-820-Doppelmutante nach Stimulation des hMrgX1-Rezeptors mit BAM8-22 nicht mehr aktiviert wird. Das BAM8-22-induzierte Ca²⁺-Signal in TRPV1-Y511A- δ 777-820-exprimierenden F11-hMrgX1-Zellen ist somit auch nicht mehr signifikant unterschiedlich zu jenem in F11-hMrgX1-Zellen.

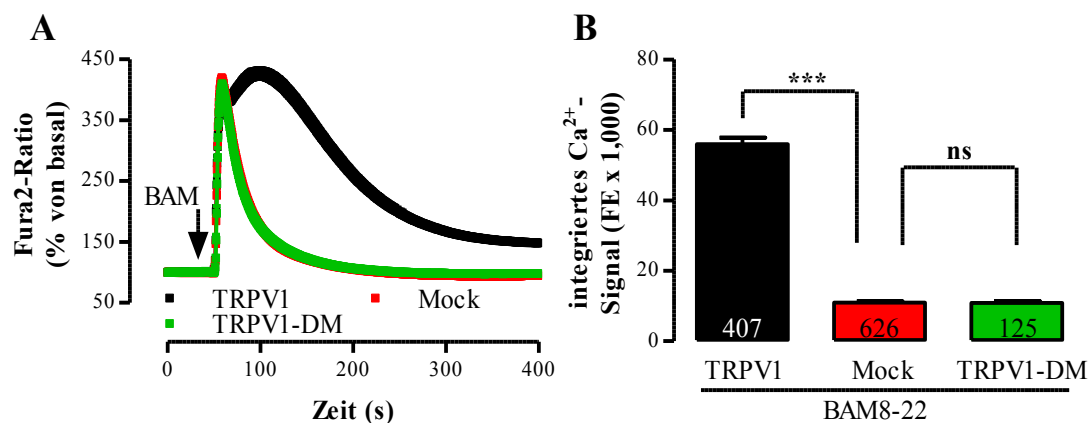


Abbildung 5.50: Keine Aktivierung der TRPV1-Y511A- δ 777-820-Mutante durch den hMrgX1-Rezeptor

(A) Ca²⁺-Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transients Expression des TRPV1 oder der TRPV1-Y511A- δ 777-820-Mutante (TRPV1-DM) und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde BAM8-22 (BAM, 2 μ M) injiziert. (B) Das integrierte Ca²⁺-Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Somit konnte mit Hilfe von drei verschiedenen TRPV1-Mutanten eine molekulare Begründung für die vollständige Inhibition der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung durch den PLC- β -Inhibitor U73122 geliefert werden. Zum einen liefert die PLC- β -vermittelte Produktion von DAG einen endogenen TRPV1-Agonisten, der über die Belegung der CAP-Bindestelle (u. a. Tyrosin 511) zu einer Aktivierung des TRPV1 führt. Zum anderen führt die PLC- β -vermittelte Degradation von PIP₂ zu einer verminderten Inhibition des TRPV1 (vermittelt über den C-Terminus), was wiederum in einer TRPV1-Aktivierung resultiert. Fehlen sowohl die DAG- als auch die PIP₂-Bindestelle, kommt es auch nach einer hMrgX1-Rezeptoraktivierung nicht mehr zu einem TRPV1-vermittelten Ca²⁺-Einstrom aus dem extrazellulären Raum. In Tabelle 5.4 sind diese Befunde sowie der relative Beitrag beider Signalwege zur TRPV1-Aktivierung nochmals zusammenfassend dargestellt.

Ergebnisse

Tabelle 5.4: Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung

	Mock	TRPV1	Y511A	δ777-820	Y511A-δ777-820
Ca²⁺-Signal (FE x 1000)	11 ± 0,4	56 ± 2	24 ± 2	36 ± 2	11 ± 0,6
Inhibition vs. TRPV1	---	---	71 %	43 %	100 %

Integrierte BAM8-22-induzierte Ca²⁺-Signale in nicht transfizierten (Mock) und in F11-hMrgX1-Zellen nach Transfektion verschiedener TRPV1-Konstrukte sind angegeben. Zusätzlich wurde der TRPV1-abhängige Anteil dieser Ca²⁺-Signale bestimmt, wobei der Wert des WT TRPV1 als Referenz fungierte und eine Verminderung dieses Wertes durch die angegebenen TRPV1-Mutationen in % berechnet wurde.

Die duale funktionelle Regulation der TRPV1-Aktivität durch den hMrgX1-Rezeptor ist zudem in Abbildung 5.51 graphisch aufgearbeitet worden. Zum einen wird der TRPV1 über einen PKC-vermittelten Mechanismus sensitisiert (linke Seite) und zum anderen durch den Abbau von PIP₂ und die Produktion von DAG direkt aktiviert (rechte Seite).

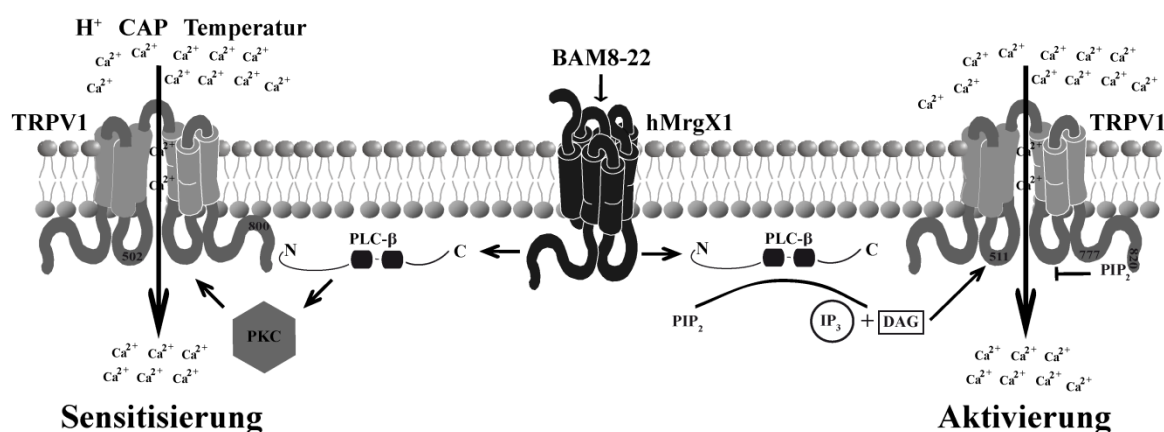


Abbildung 5.51: Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten Regulation der TRPV1-Funktion

Ausgehend vom hMrgX1-Rezeptor wird die Aktivität des TRPV1-Ionenkanals auf duale Weise über distinkte Signalwege moduliert. Linke Seite: Die PLC-β-abhängige Aktivierung der PKC führt zu einer Phosphorylierung des TRPV1-Proteins an Serin 502 und 800, wodurch der TRPV1 für seine Stimuli H⁺, CAP und erhöhte Temperatur gleichermaßen sensitisiert wird. Rechte Seite: Der TRPV1 wird zudem durch den hMrgX1-Rezeptor direkt aktiviert. Einerseits, indem PLC-β-abhängig der endogene TRPV1-Agonist DAG, der über Tyrosin 511 an den TRPV1 bindet, gebildet wird. Andererseits, indem der TRPV1 über den Abbau des tonisch inhibierenden PIP₂ (Bindestelle im Bereich des TRPV1-C-Terminus zwischen den Aminosäuren 777 und 820) disinhibiert wird.

5.3.4 Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R

In Abschnitt 5.3.2.1 wurde in F11-hMrgX1-Zellen die B2R-vermittelte PKC-abhängige Sensitivierung des TRPV1 gegenüber seinem Agonisten CAP entsprechend bestehender Literatur beschrieben (Numazaki, 2002, Vellani, 2001, Cesare, 1999). Interessanterweise stimmt die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Sensitivierung in ihrem Signalweg mit dem B2R überein, ein Befund, der auch für viele andere G_{q/11}-koppelnde GPCR beschrieben wurde (Dai, 2004, Moriyama, 2003, Ohta, 2006, Plant, 2007, Tominaga, 2001, Vellani, 2010, Moriyama, 2005). In zwei Arbeiten ist zusätzlich zur Sensitivierung auch eine direkte TRPV1-Aktivierung durch den B2R postuliert worden, dabei beruhte der Signalweg auf

dem Lipoxxygenase-Produkt 12-HPETE oder auf der Degradation von PIP₂ (Chuang, 2001, Shin, 2002).

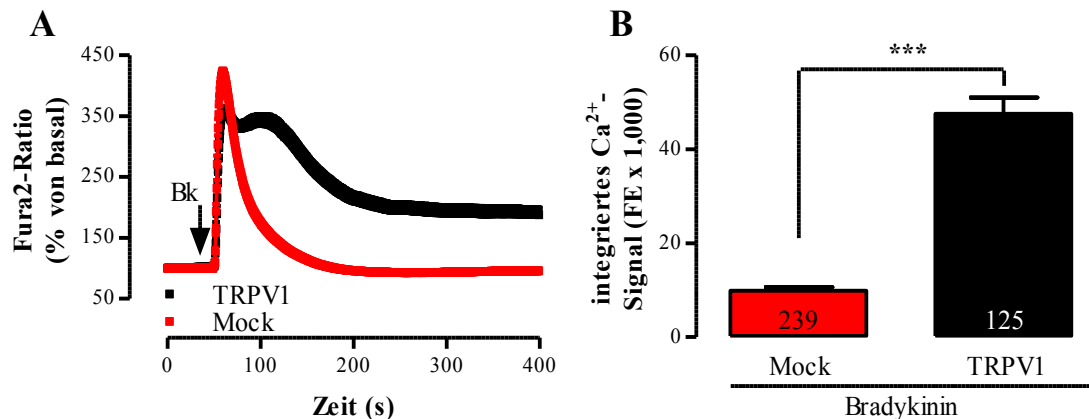


Abbildung 5.52: Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R

(A) Ca²⁺-Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde Bradykinin (Bk, 100 nM) injiziert. (B) Das integrierte Ca²⁺-Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Daher sollte die direkte TRPV1-Aktivierung durch den B2R in F11-hMrgX1-Zellen untersucht werden und, wenn möglich, deren Signalweg mit dem hMrgX1-induzierten Signalweg verglichen werden. Für diese Untersuchungen wurde die Ca²⁺-Imaging-Technik, analog zu den Versuchen mit hMrgX1-Rezeptoren genutzt. Nach der Expression des TRPV1 ergab sich (Abbildung 5.52), dass sich das Bradykinin-induzierte Ca²⁺-Signal in TRPV1-positiven Zellen durch eine zusätzliche, protrahierte Phase auszeichnete (48 ± 3 gegenüber 10 ± 1), die in ihrer Form und Dauer stark an das BAM8-22-vermittelte Ca²⁺-Signal in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen erinnerte (vgl. Abbildung 5.30). Damit führte auch die Stimulation eines weiteren G_{q/11}-koppelnden GPCR zur direkten Aktivierung des TRPV1 bei RT und neutralem pH-Wert, so dass diese Fähigkeit möglicherweise eine allgemeine Eigenschaft von G_{q/11}-koppelnden GPCR in F11-Zellen darstellt.

Weiterführend sollte nun der zu Grunde liegende Signalweg analysiert werden. Da die B2R-vermittelte TRPV1-Sensibilisierung komplett durch den PKC Inhibitor BIM-X inhibierbar war, wurde zunächst die Beteiligung der PKC an der direkten, B2R-vermittelten TRPV1-Aktivierung untersucht. Interessanterweise verhält sich der B2R hier im Vergleich mit dem hMrgX1-Rezeptor deutlich anders, da die Blockade der PKC im Vergleich mit der Lösungsmittelkontrolle DMSO zu einer Abnahme der B2R-induzierten Ca²⁺-Signales von 35 ± 4 auf 18 ± 1 , also um ~59 %, führte (Abbildung 5.53). Damit kann in Bezug auf die Sensitivität gegenüber einer PKC-Blockade die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung von der B2R-vermittelten TRPV1-Aktivierung getrennt werden.

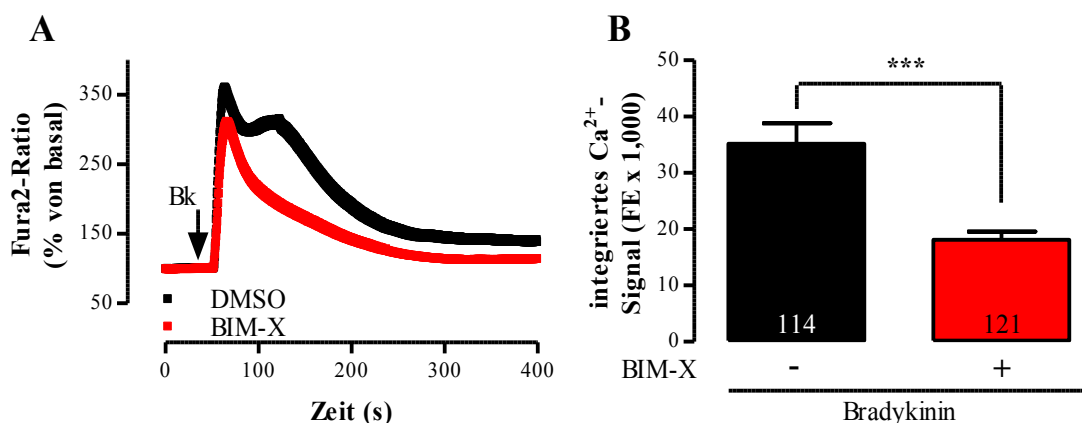


Abbildung 5.53: PKC-abhängige direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R

(A) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde Bradykinin (Bk, 100 nM) injiziert und für 30 Minuten vorher BIM-X (1 μM) oder DMSO (0,1 %) vorinkubiert. (B) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Als nächstes wurde dem Befund von Shin nachgegangen, der die Produktion von 12-HPETE durch die Lipoxxygenase als wichtige Determinante der B2R-vermittelten TRPV1-Aktivierung postulierte (Shin, 2002). Dazu wurde der in jener Arbeit verwendete Lipoxxygenase-Inhibitor NDGA bzw. das Lösungsmittel Ethanol für 30 Minuten vorinkubiert. Die Blockade der Lipoxxygenase führte im Vergleich zu Ethanol zu einer Reduktion der B2R-vermittelten Ca^{2+} -Signale von 25 ± 2 auf 15 ± 1 , also um ~52 %. Diese partielle Inhibition würde damit den Befund von Shin unterstützen und einen weiteren deutlichen Unterschied bei der direkten TRPV1-Aktivierung zwischen B2R und hMrgX1-Rezeptor darstellen (vgl. Abbildung 5.35).

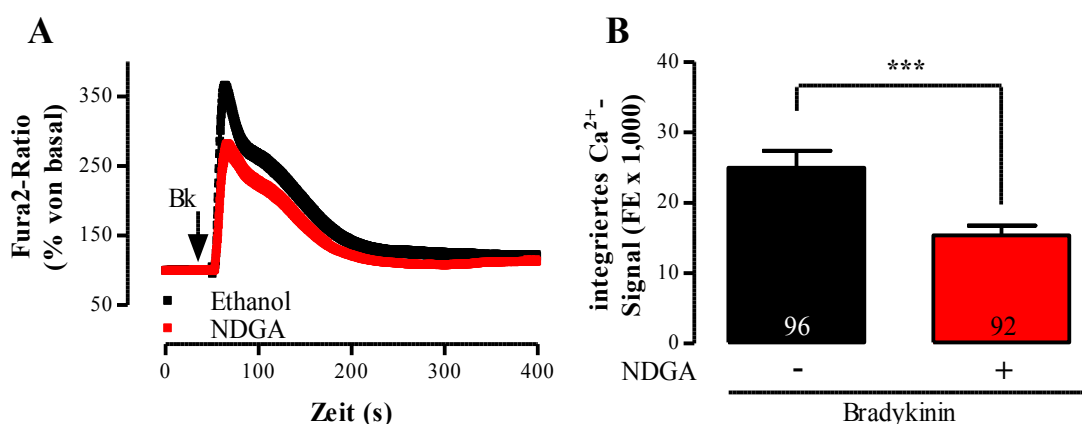


Abbildung 5.54: Lipoxxygenase-abhängige direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R

(A) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde Bradykinin (Bk, 100 nM) injiziert und für 30 Minuten vorher NDGA (5 μM) oder Ethanol (EtOH, 0,1 %) vorinkubiert. (B) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass das Lösungsmittel Ethanol die B2R-vermittelte TRPV1-Aktivierung schon deutlich kompromittierte, im Vergleich mit

F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen, die gar nicht vorbehandelt wurden, sogar um ~81 %. Im Vergleich zur Stimulation mit BAM8-22 scheint Ethanol einen dramatisch stärkeren Effekt auf B2R-vermittelte Ca^{2+} -Signale auszuüben, der Grund für diese Beobachtung bleibt allerdings unverstanden. Obwohl Shin keine Lösungsmittelkontrolle verwendete (Shin, 2002) und die hier beschriebenen inhibierenden Effekte von Ethanol groß sind, übt NDGA jedoch eine noch stärkere Inhibition der Bradykinin-vermittelten TRPV1-Aktivierung aus. Da dieser Befund für den hMrgX1-Rezeptor nicht ermittelt werden konnte, stellt er einen weiteren molekularen Unterschied in der Rezeptor-vermittelten TRPV1-Aktivierung dar.

Schließlich sollte auch für den B2R die Bedeutung von DAG-Produktion bzw. PIP_2 -Abbau für die TRPV1-Aktivierung untersucht werden, da zum einen der PIP_2 -Abbau als entscheidend für die B2R-abhängige TRPV1-Aktivierung postuliert wurde (Chuang, 2001) und da zum anderen beide Prozesse für die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung essentiell waren (vgl. Abschnitt 5.3.3).

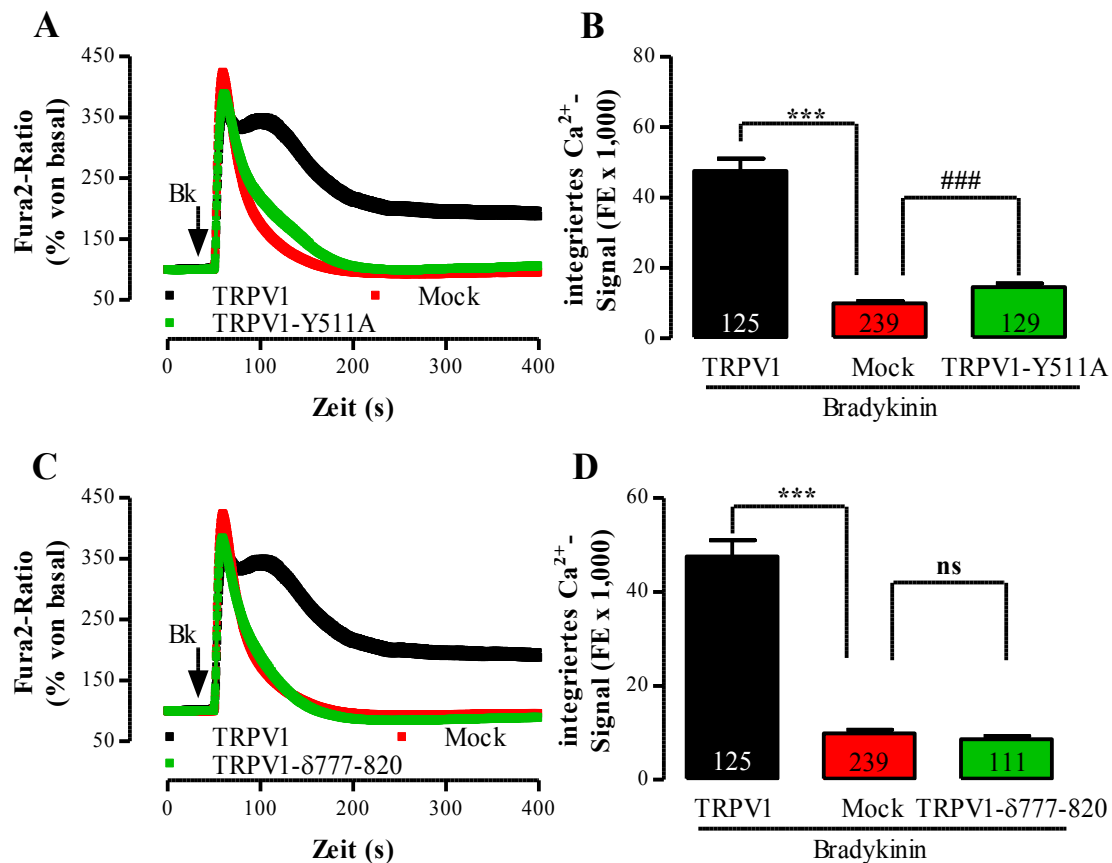


Abbildung 5.55: B2R-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung über PIP_2 -Abbau und DAG-Produktion

(A und C) Ca^{2+} -Imaging-Signale in F11-hMrgX1-Zellen nach transienter Expression des TRPV1 oder der TRPV1-Y511A- (A) bzw. der TRPV1- $\delta 777-820$ -Mutante (C) und Beladung mit Fura2-AM. Es wurde Bradykinin (Bk, 100 nM) injiziert. (B und D) Das integrierte Ca^{2+} -Signal einzelner Zellen wurde berechnet und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) x 1,000 dargestellt. Die Anzahl gemessener einzelner Zellen ist angegeben.

Ergebnisse

Zu diesem Zweck wurden die TRPV1-Mutanten TRPV1-Y511A und TRPV1- δ 777-820 als DAG- bzw. PIP₂-bindungsdefiziente Mutanten eingesetzt und deren Aktivierung nach Stimulation mit Bradykinin mit derer des TRPV1 verglichen. Abbildung 5.55A und B zeigt eine sehr starke Abhängigkeit der Bradykinin-vermittelten TRPV1-Aktivierung von der DAG-Produktion, da die TRPV1-Y511A-Mutante nur noch eine sehr geringe Ausprägung der zweiten prolongierten Phase des Ca²⁺-Signals zeigte (TRPV1-abhängige Ca²⁺-Signale: 38 ± 3 bzw. 5 ± 1). Damit ergibt sich eine Inhibition der TRPV1-Aktivierung gegenüber dem WT von ~88 %. Somit scheint die B2R-vermittelte TRPV1-Aktivierung und die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung stark von der DAG-Produktion abzuhängen und ergibt damit zusätzlich zur PKC- und zur Lipoxygenase-vermittelten TRPV1-Aktivierung einen dritten B2R-abhängigen Signalweg der TRPV1-Aktivierung. Für die Abhängigkeit von der PIP₂-Degradation ist das Bild noch deutlicher (Abbildung 5.55C und D), da die TRPV1- δ 777-820-Mutante durch Bradykinin nicht mehr aktiviert werden kann. Damit ergibt sich ein vierter Signalweg zwischen B2R und TRPV1, dessen Blockade sich im Vergleich mit dem hMrgX1-Rezeptor wiederum deutlich stärker auf die B2R-vermittelte TRPV1-Aktivierung auswirkt. Dies könnte möglicherweise daran liegen, dass sich Serin 800 im Deletionsbereich der TRPV1- δ 777-820-Mutante befindet. Somit könnte sich die Deletion auf den B2R, dessen TRPV1-Aktivierung im Gegensatz zum hMrgX1-Rezeptor PKC-abhängig war (vgl. Abbildung 5.53), quasi doppelt auswirken, indem sowohl die PIP₂-Abbau- als auch die PKC/Serin 800-vermittelte Aktivierung des TRPV1 nicht mehr möglich sind.

Tabelle 5.5: Zusammenfassender Vergleich der B2R- und hMrgX1-induzierten, TRPV1-aktivierenden Signalwege

	PKC	Lipoxygenase	DAG-Produktion	PIP ₂ -Abbau
B2R	59 %	52 %	88 %	100 %
hMrgX1	kein Einfluss	kein Einfluss	71 %	43 %

Der Beitrag der angegebenen Signalwege zur B2R- bzw. hMrgX1-induzierten direkten TRPV1-Aktivierung wurde analog zu Tabelle 5.4 berechnet und ist in % angegeben. Dabei wurde ein Beitrag von DAG-Produktion und PIP₂-Abbau durch verschiedene TRPV1-Mutanten ermittelt, während die Bedeutung der PKC oder der Lipoxygenase über die Sensitivität gegenüber spezifischen Inhibitoren des jeweiligen Enzyms bestimmt wurde.

Damit kann abschließend konstatiert werden, dass verschiedene G_{q/11}-koppelnde GPCR in der Lage sind, den TRPV1-Ionenkanal in F11-hMrgX1-Zellen sowohl zu sensibilisieren als auch direkt bei RT und neutralem pH-Wert zu aktivieren. Die zu Grunde liegenden Signalwege der TRPV1-Sensibilisierung stimmen dabei für die hier untersuchten GPCR überein. In Bezug auf die Signalwege, die zur direkten TRPV1-Aktivierung führen, bestehen aber einerseits Unterschiede zur TRPV1-Sensibilisierung und andererseits Unterschiede zwischen unterschiedlichen GPCR. Während vom B2R viele divergierende Signalwege ausgehen, die alle für die TRPV1-Aktivierung hohe Bedeutung haben und weitgehend parallel ablaufen müssen, benötigt der hMrgX1-Rezeptor von der PLC- β

ausgehend nur wenige Signalwege, die schließlich konvergierend und additiv auf die TRPV1-Aktivierung einwirken (Tabelle 5.5).

Trotz dieser Unterschiede konnten mit der Etablierung der Sensibilisierung und direkten Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor Signalwege definiert werden, die auch durch den etablierten Schmerzmediator Bradykinin aktiviert werden, und damit dem hMrgX1-Rezeptor eine schmerzfördernde Rolle zuweisen. Die in dieser Arbeit vorgestellte duale Regulation des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor könnte somit möglicherweise als molekulare Begründung für die pro-algetischen Effekte einer Applikation von BAM8-22 im Menschen verantwortlich sein (Sikand, 2011).

5.4 hMrgX1-Rezeptoren regulieren die Expression schmerz-relevanter Gene

5.4.1 Genregulation über die Serin/Threonin-Kinasen Erk-1/2

5.4.1.1 hMrgX1-vermittelte Aktivierung von Erk-1/2

Bei ihrer Klonierung wurden hMrgX1-Rezeptoren aufgrund ihrer hohen Homologie nach dem MAS1-Onkogen benannt (Dong, 2001). Onkogene Eigenschaften werden in der Regel über eine Modulation der Genexpression vermittelt. So fand man für das MAS1-Gen u. a. eine Entwicklung solider Tumore in Nacktmäusen, nachdem mit MAS1 transfizierte Zellen unter die Haut gespritzt wurden, sowie eine verstärkte Proliferation von transfizierten 3T3-Fibroblasten und neuronalen NT115-401L-Zellen (Jackson, 1988, Young, 1986). Die Fähigkeit von hMrgX1-Rezeptoren, die Genexpression zu modulieren, ist bislang nicht untersucht worden, so dass im Folgenden der Frage nachgegangen werden soll, ob und wenn ja über welche Signaltransduktionskomponenten hMrgX1-Rezeptoren zur Geninduktion oder Genrepression fähig sind. In Abschnitt 5.1.4 wurde bereits dargestellt, dass hMrgX1-Rezeptoren in der Lage sind die Serin/Threonin-Kinasen Erk-1/2 in HEK293-hMrgX1-Zellen zu aktivieren. Erk-1/2 sind Isoenzyme der MAPK-Familie und in der Lage proliferative Prozesse auszulösen (Meloche, 2007), ihre Aktivierung würde somit gut zu den onkogenen Befunden des MAS1-Gens passen. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass Spinalganglienneurone terminal differenzierte Zellen ohne jede proliferative Kapazität darstellen. So sollte der Fokus einer potentiell hMrgX1-vermittelten Regulation der Genexpression nicht auf proliferativen Effekten, sondern auf einer distinkten Expression von Genen liegen, die am Prozess der Schmerzchronifizierung beteiligt sind.

Zunächst sollte jedoch die Erk-1/2-Aktivierung durch hMrgX1-Rezeptoren genauer analysiert werden. Daher wurden zunächst in HEK293-hMrgX1-Zellen Stimulationskinetiken mit BAM8-22 durchgeführt und mittels Immunoblot die Phosphorylierung und damit Aktivierung der Erk-1/2 analysiert. Abbildung 5.56A und C zeigen die resultierende, schnelle Aktivierung der Erk-1/2 nach 2,5 und 5 Minuten Stimulationszeit, die im Laufe der nächsten 25 Minuten auf den basalen Wert zurückgeführt wird. Zusätzlich wurde bei einer Stimulationszeit von 5 Minuten eine Konzentration-Wirkungskurve der Erk-1/2-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor erstellt (Abbildung 5.56B und D). Dabei ergab sich ein EC_{50} -Wert von ~ 110 nM, was in guter Übereinstimmung mit dem ermittelten Wert aus dem Fura2-basierenden Ca^{2+} -Mobilisationsversuch steht (vgl. Tabelle 5.1) und damit möglicherweise auf eine lineare Signaltransduktionskaskade hindeutet.

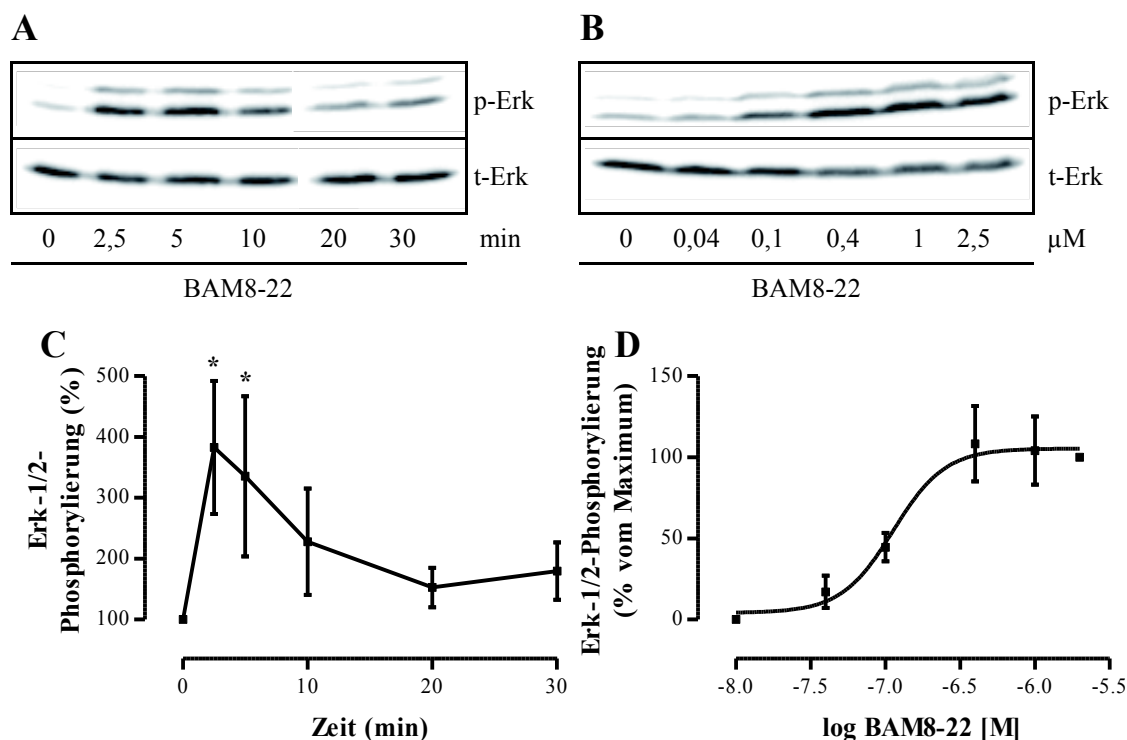


Abbildung 5.56: Erk-1/2-Aktivierung in HEK293-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22

(A und B) HEK293-hMrgX1-Zellen wurden mit BAM8-22 für unterschiedliche Zeiten mit einer Konzentration von 1 µM (A) oder mit unterschiedlichen Konzentrationen für 5 Minuten (B) stimuliert und anschließend lysiert. Die Erk-1/2-Phosphorylierung wurde dann durch Immunoblot mit dem p-Erk-1/2-Antikörper (p-Erk) analysiert. Danach wurde der p-Erk-1/2-Antikörper wieder von der Membran abgelöst und die Membran wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelspuren mit dem Erk-2-Antikörper (t-Erk) inkubiert. (C und D) Quantifizierung der Erk-1/2-Phosphorylierung. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Schwärzung der p-Erk-1/2-Banden quantifiziert und diese Daten wurden auf die Schwärzung in der Ladekontrolle Erk-2 normiert. Die so quantifizierten Daten wurden anschließend auf den jeweiligen Basalwert (0 min BAM8-22) bezogen. In (D) wurden die Effekte der maximalen BAM8-22-Konzentration auf 100 % gesetzt und die der anderen Konzentrationen relativ dazu dargestellt. Mittels nicht-linearer Regression wurde eine Ausgleichskurve berechnet, aus der sodann der EC₅₀-Wert ermittelt werden konnten. Es wurden drei (A und C) bzw. vier (B und D) unabhängige Experimente durchgeführt.

Um diesen Befund zu erhärten, sollte die Erk-1/2-Aktivierung über den hMrgX1-Rezeptor auch in F11-hMrgX1-Zellen untersucht werden. Es wurde daher eine Stimulationskinetik mit BAM8-22 durchgeführt und nachfolgend die Erk-1/2-Phosphorylierung im Immunoblot analysiert. Der kinetische Ablauf aus den HEK293-hMrgX1-Zellen konnten auch in F11-hMrgX1-Zellen bestätigt werden, da auch hier eine schnelle, aber transiente Erk-1/2-Aktivierung nach 2,5 und 5 Minuten sichtbar war (Abbildung 5.57), so dass der hMrgX1-Rezeptor in beiden Expressionssystemen möglicherweise die selben Signaltransduktionskomponenten nutzt, um die Erk-1/2 zu aktivieren.

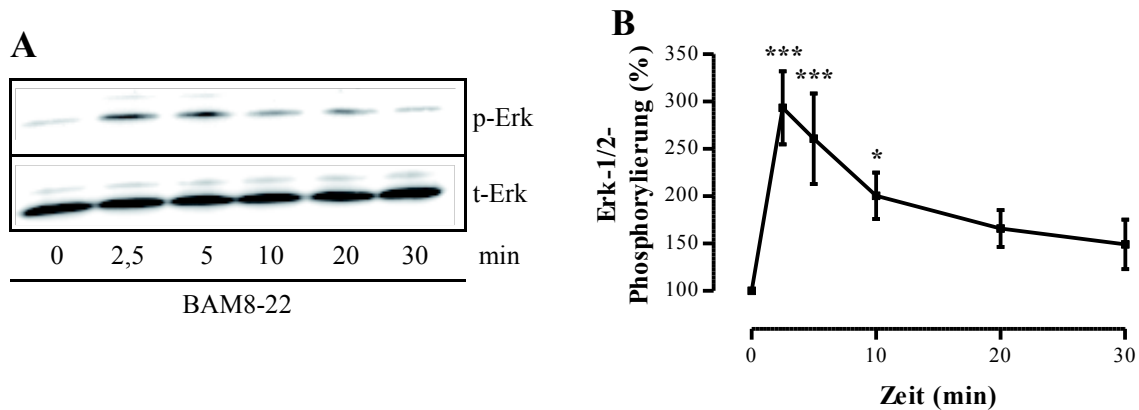


Abbildung 5.57: Erk-1/2-Aktivierung in F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22

(A) F11-hMrgX1-Zellen wurden mit BAM8-22 (1 μ M) für unterschiedliche Zeiten stimuliert und anschließend lysiert. Die Erk-1/2-Phosphorylierung wurde dann durch Immunoblot mit dem p-Erk-1/2-Antikörper (p-Erk) analysiert. Danach wurde der p-Erk-1/2-Antikörper wieder von der Membran abgelöst und die Membran wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelspuren mit dem Erk-2-Antikörper (t-Erk) inkubiert. (B) Quantifizierung der Erk-1/2-Phosphorylierung. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Schwärzung der p-Erk-1/2-Banden quantifiziert und diese Daten wurden auf die Schwärzung in der Ladekontrolle Erk-2 normiert. Die so quantifizierten Daten wurden anschließend auf den jeweiligen Basalwert (0 min BAM8-22) bezogen. Es wurden sieben unabhängige Experimente durchgeführt.

5.4.1.2 hMrgX1-vermittelte Aktivierung von Erk-1/2-abhängigen Reporter-genkonstrukten

Ausgehend von einer aktivierten Erk-1/2 ist ein Einfluss auf die transkriptionelle Regulationsmaschinerie über verschiedene Transkriptionsfaktoren denkbar. Eine in Neuronen besonders gut untersuchte Möglichkeit stellt dabei die Aktivierung von CREB dar, welche wahrscheinlich über eine Phosphorylierung von Serin 133 innerhalb des CREB-Proteins vermittelt wird (Shaywitz, 1999). Eine CREB-Aktivierung kann prinzipiell über den Phosphorylierungsstatus von Serin 133, sicherer jedoch über die Messung von CREB-abhängiger Transkription nachgewiesen werden. Daher wurde zu diesem Zweck ein CREB-abhängiges Reporter-genkonstrukt eingesetzt (vgl. Tabelle 4.3), in dem die Aktivität eines basalen Promoters durch die Bindung von sechs CREB-Molekülen an entsprechende Konsensussequenzen deutlich erhöht werden kann, was schließlich zur erhöhten Expression des Reportergens, in diesem Fall der Luziferase, führt.

HEK293-hMrgX1- bzw. F11-hMrgX1-Zellen wurden mit dem 6xCRE-Luz-Vektor transfiziert und für 6 oder 24 Stunden mit BAM8-22 (1 μ M) oder mit dem AC-aktivierenden Agens FSK (5 μ M) stimuliert. Sodann wurde die Luziferasemenge bestimmt, indem die Lichtemission beim enzymatischen Umsatz des Substrates Luminol gemessen wurde (vgl. Abschnitt 4.2.3.6). In Abbildung 5.58 zeigt sich, dass sowohl in HEK293-hMrgX1- als auch in F11-hMrgX1-Zellen durch Stimulation des hMrgX1-Rezeptors keine signifikante Erhöhung der Luziferaseexpression ausgelöst wurde. Da gleichzeitig die Stimulation mit FSK zu einer deutlichen Luziferaseinduktion führte (HEK293-hMrgX1: 17 ± 3 -fach; F11-hMrgX1: 6 ± 1 -fach; jeweils nach 24 Stunden),

Ergebnisse

können technische Gründe als Erklärungsmöglichkeit für eine fehlende Aktivierung des Reporter-genkonstruktes ausgeschlossen werden und es muss davon ausgegangen werden, dass die hMrgX1-vermittelte Erk-1/2-Aktivierung nicht in einer Aktivierung transkriptioneller Aktivität über den Transkriptionsfaktor CREB resultiert.

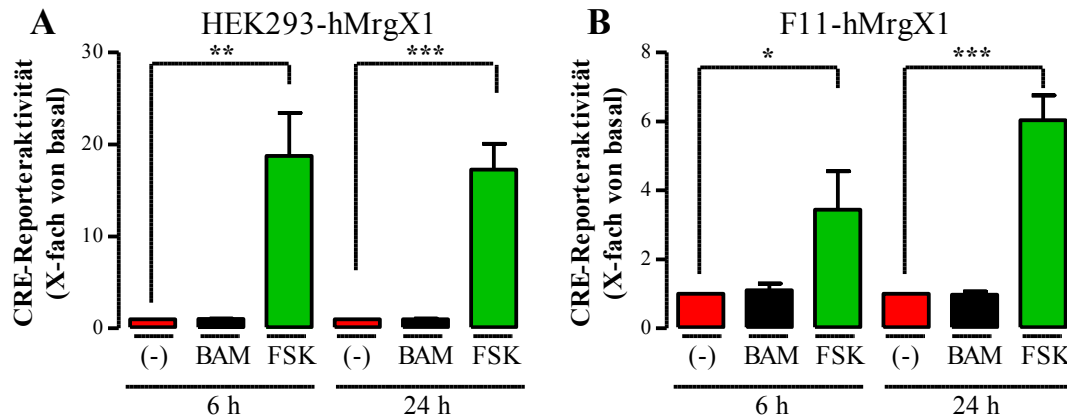


Abbildung 5.58: Keine hMrgX1-vermittelte Aktivierung des CREB-abhängigen Reporter-genkonstruktes in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen

(A und B) CRE-Reporteraktivität in HEK293-hMrgX1- (A) oder F11-hMrgX1-Zellen (B) nach Stimulation für 6 oder 24 Stunden mit BAM8-22 (BAM, 1 μ M) oder FSK (5 μ M). In jedem Experiment wurde die Luziferase-abhängige Lichtemission von stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen und auf den jeweiligen basalen Wert normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Neben der Aktivierung von CREB-abhängiger Transkription ist es auch denkbar, dass die aktivierte Erk-1/2 über sog. *ternary complex factors* (TCF) in Verbindung mit dem Transkriptionsfaktor Srf zu einer modulierten Genexpression beiträgt (Knoll, 2009). Um dieser Hypothese nachzugehen, wurde im Rahmen dieser Arbeit der Fos-Luz-Vektor eingesetzt (vgl. Tabelle 4.3), in dem große Teile des c-Fos-Promoters die Expression der Luziferase regulieren.

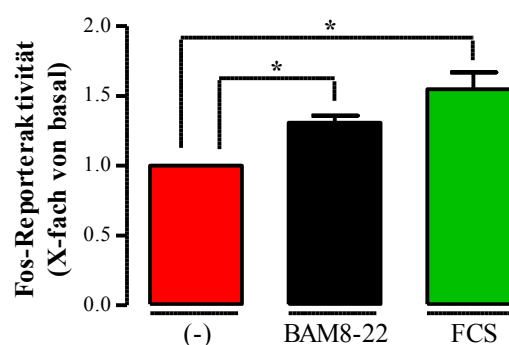


Abbildung 5.59: hMrgX1-vermittelte Aktivierung des Fos-Luz-Vektors in HEK293-hMrgX1-Zellen

Fos-Reporteraktivität in HEK293-hMrgX1-Zellen nach Stimulation für 6 Stunden mit BAM8-22 (1 μ M) oder FCS (10 %). In jedem Experiment wurde die Luziferase-abhängige Lichtemission von stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen und auf den jeweiligen basalen Wert normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Nach Transfektion dieses Plasmides in HEK293-hMrgX1-Zellen und Stimulation mit BAM8-22 war eine deutliche Erhöhung der Luziferaseexpression erkennbar

Ergebnisse

($1,3 \pm 0,05$ -fach), was auf ein genregulatorisches Potential des hMrgX1-Rezeptors hindeutet (Abbildung 5.59). Als Referenz wurde FCS eingesetzt, da es zu einer ähnlich starken Erk-1/2-Phosphorylierung in HEK293-hMrgX1-Zellen führte (vgl. Abbildung 5.7). Dieser Befund setzte sich auch auf Ebene des Fos-Luz-Vektors fort ($1,5 \pm 0,1$ -fach), so kann von einer realen hMrgX1-abhängigen Reporterageninduktion ausgegangen werden.

Das Fos-Luz-Plasmid enthält Konsensussequenzen für den Transkriptionsfaktor *signal transducer and activator of transcription 3* (STAT-3) sowie für das c-Fos/c-Jun Dimer *activator protein 1* (AP-1) und das Dimer aus einem TCF und Srf (Cen, 2003). Damit ist aus einer Aktivierung des Fos-Reporters noch nicht konsequent ableitbar, welcher dieser drei Transkriptionsfaktoren vom hMrgX1-Rezeptor aktiviert wird. Ein Reportergenkonstrukt, in dem nur Konsensussequenzen für eine TCF/Srf-abhängige Transkriptionsregulation vorhanden sind (5xSRE-Luz), sollte dieses Problem lösen (vgl. Tabelle 4.3).

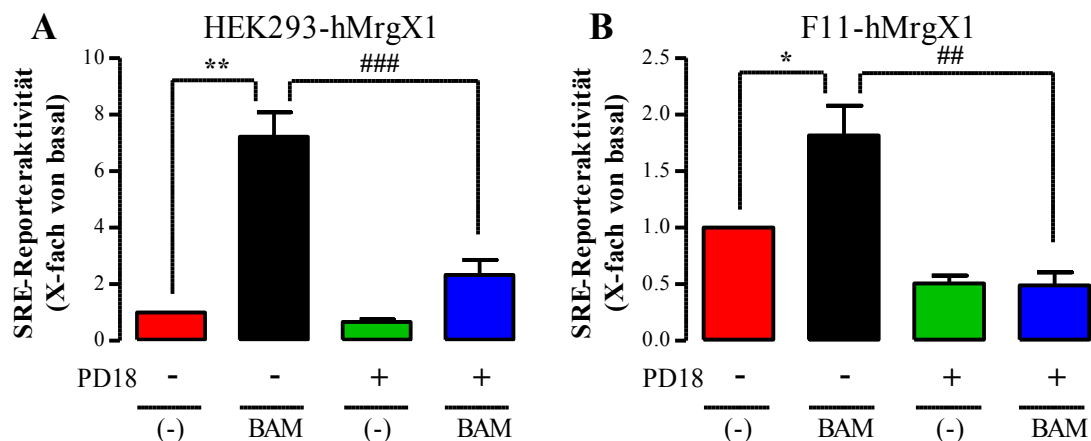


Abbildung 5.60: hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 5xSRE-Luz-Vektors in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen über Erk-1/2

(A und B) SRE-Reporteraktivität in HEK293-hMrgX1- (A) oder F11-hMrgX1-Zellen (B) nach Stimulation für 6 Stunden mit BAM8-22 (BAM, 1 μ M). Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit PD184352 (PD18, 10 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. In jedem Experiment wurde die Luziferase-abhängige Lichtemission von stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen und auf den jeweiligen basalen Wert normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Dieses Plasmid wurde auch in HEK293-hMrgX1-Zellen transfiziert und nach 6 Stunden Stimulation mit BAM8-22 (Abbildung 5.60A) war eine sehr deutliche Luziferaseinduktion (7 ± 1 -fach) zu messen. Diese deutlichere Erhöhung des Signals im Vergleich mit dem Fos-Luz-Vektor ist wohl vor allem dem fünfmaligen Vorhandensein der TCF/Srf-Konsensussequenz geschuldet. Nachfolgend sollte daher überprüft werden, ob die Reporterageninduktion durch einen Erk-1/2-Inhibitor, genauer gesagt durch einen Inhibitor der vorgeschalteten MKK1 (vgl. Abschnitt 5.3.3.4), negativ beeinflusst werden kann. Nach vorheriger Inkubation mit PD184352 konnte die Reporterageninduktion um ~70 % ($2,3 \pm 0,5$ -fach) inhibiert werden (Abbildung 5.60A), womit in HEK293-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 eine Signaltransduktionskaskade ausgehend vom

Ergebnisse

hMrgX1-Rezeptor gestartet wird, die über die Phosphorylierung der Erk-1/2 in einer TCF/Srf-abhängigen Transkriptionsmodulation resultiert.

Dieser neue und interessante Befund sollte sodann in F11-hMrgX1-Zellen verifiziert werden. Der gleichen Strategie folgend, wurde mit BAM8-22 für 6 Stunden stimuliert, während einige Zellen mit dem Erk-1/2-Inhibitor PD184352 vorbehandelt wurden. In Abbildung 5.60B ist zu erkennen, dass das Bild aus den HEK293-hMrgX1-Zellen in F11-hMrgX1-Zellen komplett bestätigt werden konnte. BAM8-22 führte zu einer Induktion der Luziferase ($1,8 \pm 0,3$ -fach), welche durch die vorherige Inkubation mit PD184352 vollständig blockiert wurde ($0,5 \pm 0,1$ -fach für PD184352-behandelte Zellen mit oder ohne BAM8-22-Stimulation). Die vollständige Inhibition der hMrgX1-vermittelten Reporterogeninduktion durch PD184352 in F11-hMrgX1-Zellen könnte möglicherweise der hier vorliegenden geringeren Signalstärke geschuldet sein. Trotzdem war auch in F11-hMrgX1-Zellen eine signifikante TCF/Srf-abhängige Transkription messbar, womit postuliert werden kann, dass die TCF/Srf-Konsensussequenz im Fos-Luz-Vektor für die hMrgX1-vermittelte Luziferaseinduktion verantwortlich zeichnet.

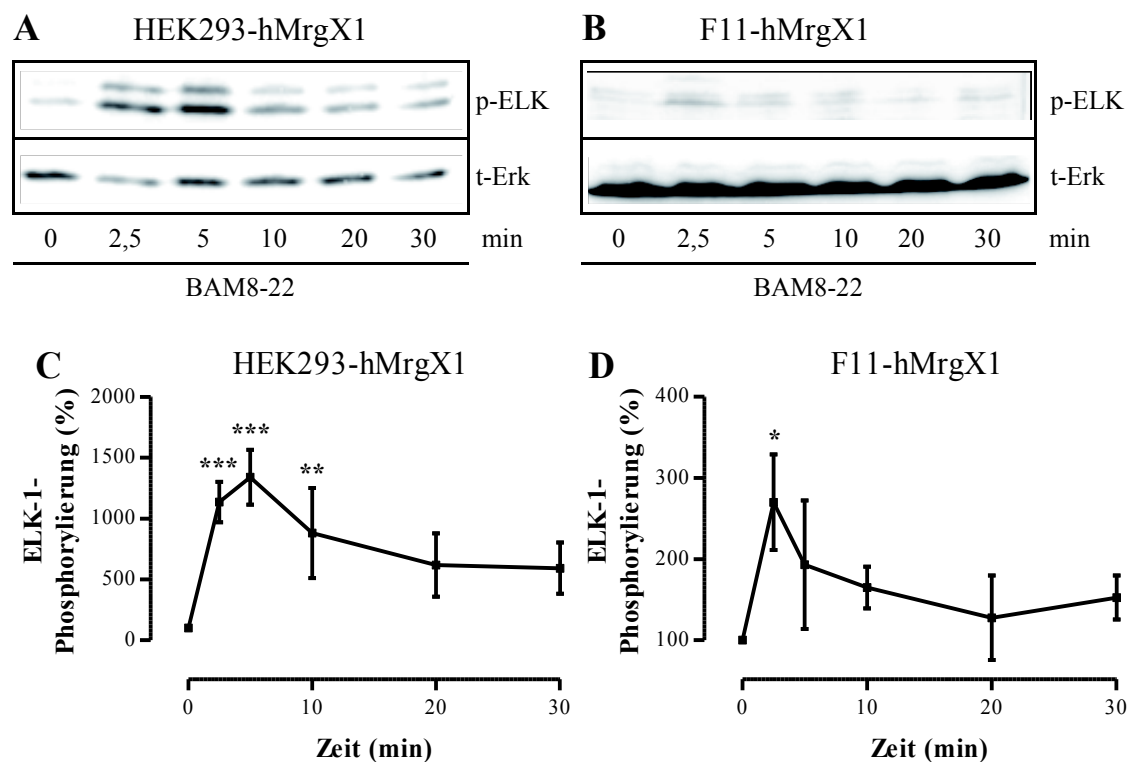


Abbildung 5.61: ELK-1-Aktivierung in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22
(A und B) HEK293-hMrgX1- (A) oder F11-hMrgX1-Zellen (B) wurden mit BAM8-22 für unterschiedliche Zeiten mit einer Konzentration von 1 μ M stimuliert und anschließend lysiert. Die ELK-1-Phosphorylierung wurde dann durch Immunoblot mit dem p-ELK-1-Antikörper (p-ELK) analysiert. Danach wurde der p-ELK-1-Antikörper wieder von der Membran abgelöst und die Membran wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelspuren mit dem Erk-2-Antikörper (t-Erk) inkubiert. (C und D) Quantifizierung der ELK-1-Phosphorylierung. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Schwärzung der p-ELK-1-Banden quantifiziert und diese Daten wurden auf die Schwärzung in der Ladekontrolle Erk-2 normiert. Die so quantifizierten Daten wurden anschließend auf den jeweiligen Basalwert (0 min BAM8-22) bezogen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Die Gruppe der TCF besteht aus den drei Mitgliedern *E twenty-six-like transcription factor 1* (ELK-1), *srf accessory protein 1* und NET (Buchwalter, 2004). Die Erk-1/2-abhängige Aktivierung von ELK-1 erfolgt durch die Phosphorylierung von ELK-1 an Serin 383 nach der Translokation der Erk-1/2 in den Nukleus und kann durch Phosphorylierungs-spezifische Antikörper nachgewiesen werden (Treisman, 1994). Um Hinweise auf den, durch hMrgX1-Rezeptoren aktivierten TCF zu erhalten, wurden daher Stimulationskinetiken mit BAM8-22 in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen durchgeführt und die ELK-1-Phosphorylierung (vgl. Abschnitt 4.1.4.1) im Immunoblot analysiert. In Abbildung 5.61 sind die entsprechenden Immunoblots dargestellt. In beiden Zellsystemen induzierte BAM8-22 eine deutliche Phosphorylierung von ELK-1 nach 2,5 und 5 Minuten. Damit gleicht die Kinetik der ELK-1-Aktivierung jener der Erk-1/2-Phosphorylierung. Dieser Befund macht es sehr wahrscheinlich, dass ELK-1 eine bedeutsame Rolle bei der hMrgX1-vermittelten Aktivierung von TCF/Srf-abhängiger Transkription spielt und deutet damit darauf hin, dass der hMrgX1-Rezeptor über Erk-1/2 und ELK-1 transkriptionelle Prozesse regulieren kann.

5.4.1.3 Induktion TCF/Srf-abhängiger Gene durch hMrgX1-Rezeptoren in F11-hMrgX1-Zellen

Nachdem etabliert wurde, dass der hMrgX1-Rezeptor über die Aktivierung der Erk-1/2 zur transkriptionellen Regulation befähigt ist, sollte im Weiteren der Fokus auf konkreten Genen liegen, die TCF/Srf-abhängig reguliert werden. Da die Induktion bzw. Repression konkreter Gene stark vom jeweiligen Zellsystem abhängig ist, wurden die folgenden Versuche in den Spinalganglienneuronen-ähnlichen F11-hMrgX1-Zellen durchgeführt. 2009 veröffentlichten Knöll und Nordheim einen Übersichtsartikel, der sich mit der neuronalen Induktion von Srf-abhängigen Genen befasst (Knoll, 2009). Dabei erstellten sie eine Tabelle, in der alle Gene gelistet wurden, deren Promoter von Srf gebunden wird bzw. deren neuronale Expression durch Srf-Defizienz moduliert wird. Ausgehend von dieser Liste wurden im Rahmen dieser Arbeit 15 Gene ausgewählt, die als sog. IEG bezeichnet werden, also Gene, deren mRNA Induktion sehr schnell und ohne vorherige Proteinsynthese vonstatten geht. In einem Rasteransatz wurde die transkriptionelle Regulation dieser 15 Gene auf mRNA-Ebene durch quantitative PCR untersucht (vgl. Abschnitt 4.2.3.5). Dafür wurden F11-hMrgX1-Zellen für 1 Stunde mit BAM8-22 stimuliert, totale RNA wurde isoliert und in cDNA revers transkribiert. Das resultierende Ergebnis der quantitativen PCR ist in Abbildung 5.62 dargestellt. Die Sequenzen der genutzten Primer finden sich in tabellarischer Form in Anhang XI. Es ergab sich, dass von den 15 Genen zwei Gene, nämlich c-Fos und EGR-1, durch die BAM8-22-Stimulation signifikant induziert wurden (rote Balken), während die anderen 13 Gene unverändert blieben. Damit kann die hMrgX1-vermittelte Genregulation insofern erweitert werden, dass der prinzipiellen Fähigkeit, TCF/Srf-abhängige Transkription zu regulieren, konkrete Gene, deren Transkriptmenge moduliert wird, hinzugefügt werden

Ergebnisse

können. Die Induktion des c-Fos-Gens stimmt dabei mit der Induktion des Fos-Luz Reportergenkonstruktes (vgl. Abbildung 5.59) überein.

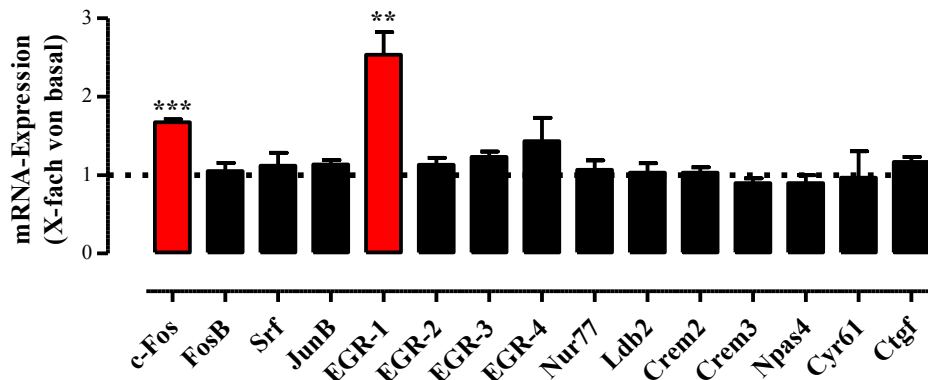


Abbildung 5.62: Induktion Srf-abhängiger Gene in F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22

Relative mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 (1 h, 1 μ M). Die relative Expression von 15 Genen wurde mittels quantitativer PCR bestimmt, indem die Expression des jeweiligen Zielgens auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta$ Cp-Methode normiert wurde. Signifikant induzierte Gene sind mit einem roten Balken gekennzeichnet. Es wurden drei unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Im Kontext der Schmerzchronifizierung, dem Ausgangspunkt für die Studie der transkriptionellen Modulation durch hMrgX1-Rezeptoren, erscheinen sowohl c-Fos als auch EGR-1 als interessante Gene. Obwohl die c-Fos-Induktion nach einem Schmerzreiz klassischerweise auf der Ebene des spinalen Hinterhorns untersucht wurde (Bullitt, 1989), konnte kürzlich auch auf Ebene der Spinalganglienneurone die Erk-1/2-abhängige Induktion von c-Fos mit der Applikation von operativen Schmerzreizen korreliert werden (Romero, 2012). Ebenso wurde die Induktion von EGR-1 in Spinalganglienneuronen sowohl nach Stimulation mit Neurotrophenen unter Zellkulturbedingungen als auch nach Karrageen-induzierter Inflammation in Mäusen beschrieben (Kendall, 1994, Utreras, 2009). Außerdem ist in EGR-1-defizienten Mäusen eine verminderte Schmerzrate in der späten Phase des Formalin-Testes sowie eine reduzierte mechanische Allodynie nach der Injektion von komplettem Freund'schem Adjuvans beschrieben worden (Ko, 2005). Damit stellen beide Gene zumindest molekulare Marker wenn nicht sogar kausal beteiligte Signaltransduktionskomponenten dar, die an der Schmerzchronifizierung beteiligt sind.

Nach diesem interessanten Befund sollte im nächsten Schritt verifiziert werden, dass die Induktion von c-Fos und EGR-1 über die Aktivierung der Erk-1/2 und damit höchst wahrscheinlich über TCF/Srf vermittelt wird. Zu diesem Zweck wurden wiederum F11-hMrgX1-Zellen für 1 h mit BAM8-22 stimuliert. Allerdings wurde durch die vorherige Inkubation mit PD184352 die Aktivierung der Erk-1/2 inhibiert, während parallel als geeignete Lösungsmittelkontrolle DMSO vorinkubiert wurde. In der quantitativen PCR ergab sich, dass die Induktion von c-Fos ($1,7 \pm 0,03$ -fach) durch die Blockade der Erk-1/2 ($1,0 \pm 0,1$ -fach) vollständig verhindert werden konnte (Abbildung 5.63). Ebenso wurde die EGR-1-Induktion ($2,5 \pm 0,3$ -fach) durch PD184352 vollständig

Ergebnisse

($0,9 \pm 0,1$ -fach) inhibiert. Damit kann als gesichert angesehen werden, dass die Stimulation von hMrgX1-Rezeptoren über die Aktivierung der Erk-1/2 zur Induktion der IEG c-Fos und EGR-1 führt. ELK-1 als Vertreter der TCF und Srf sind dabei höchst wahrscheinlich als Transkriptionsfaktoren für die vermehrte Transkriptionsinitiation verantwortlich.

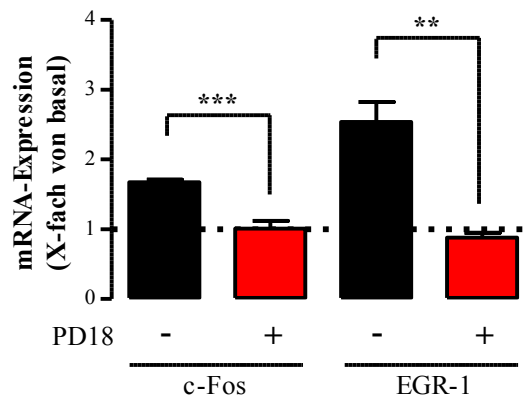


Abbildung 5.63: hMrgX1-vermittelte Induktion von c-Fos und EGR-1 in F11-hMrgX1-Zellen über Erk-1/2

Relative mRNA-Expression von c-Fos oder EGR-1 in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 (1 h, 1 μ M). Die relative Expression wurde mittels quantitativer PCR bestimmt, indem die Expression des jeweiligen Zielgens auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta$ Cp-Methode normiert wurde. Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit PD184352 (PD18, 10 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0.1 %, keine Beschriftung) vorbehandelt. Es wurden drei unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Zur weiteren Bestätigung dieses Befundes wurde in einem nächsten Schritt analysiert, ob sich die erhöhte mRNA-Menge in eine erhöhte Translation überträgt. Aufgrund der stärkeren Induktion auf mRNA-Ebene wurde dafür das EGR-1-Gen ausgewählt. Nachdem bekannt war, dass nach 1 Stunde Stimulationszeit eine erhöhte Menge EGR-1-mRNA nachweisbar war, wurde eine breiter angelegte Stimulationskinetik mit Stimulationszeiten von 1 bis 4 Stunden durchgeführt. Die resultierenden Zelllysate wurden im Immunoblot analysiert, wobei die Membran nach dem Proteintransfer auf Höhe der 55 kDa-Bande des Größenstandards horizontal geschnitten wurde. Dadurch konnte gleichzeitig die EGR-1-Expression im oberen Teil der Membran nachgewiesen (vgl. Abschnitt 4.1.4.1) und zur Beladungskontrolle die Expression der Erk-2 auf dem unteren Teil der Membran analysiert werden (die Molekulargewichte von EGR-1 und Erk-2 betragen 82 bzw. 42 kDa). In Abbildung 5.64 ist sowohl ein repräsentativer Immunoblot, als auch die Quantifizierung der entsprechenden Banden dargestellt. Es zeigte sich, dass durch eine 2-stündige BAM8-22-Stimulation die Expression von EGR-1-Proteinen signifikant erhöht wird (124 ± 4 %). Dabei steigt die EGR-1-Expression in den ersten 2 Stunden langsam an, hat bei 2 Stunden das Maximum erreicht und fällt dann sehr schnell wieder auf das basale Expressionsniveau zurück. Somit konnten die Befunde der quantitativen PCR auch auf Proteinebene bestätigt werden und es ergibt sich in F11-hMrgX1-Zellen die Induktion des IEG EGR-1 über Erk-1/2 und wahrscheinlich über ELK-1/Srf nach Stimulation mit BAM8-22.

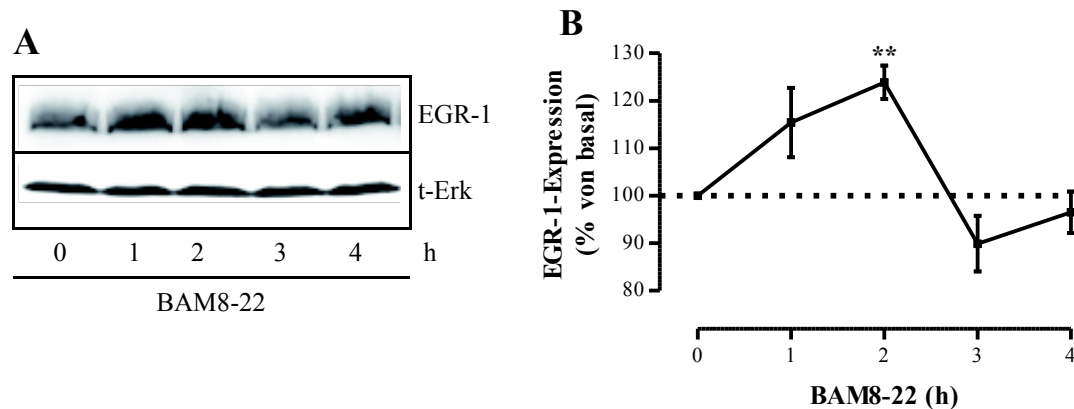


Abbildung 5.64: hMrgX1-vermittelte Induktion von EGR-1-Proteinen in F11-hMrgX1-Zellen

(A) F11-hMrgX1-Zellen wurden mit BAM8-22 für unterschiedliche Zeiten mit einer Konzentration von 1 μ M stimuliert und anschließend lysiert. Die EGR-1-Expression wurde dann durch Immunoblot analysiert. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelspuren wurde die Membran nach dem Proteintransfer horizontal geschnitten und der untere Teil (Proteine bis 55 kDa) mit dem Erk-2-Antikörper (t-Erk) inkubiert. (B) Quantifizierung der EGR-1-Expression. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Schwärzung der EGR-1-Bande quantifiziert und diese Daten wurden auf die Schwärzung in der Ladekontrolle Erk-2 normiert. Die so quantifizierten Daten wurden anschließend auf den jeweiligen Basalwert (0 h BAM8-22) bezogen. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt.

5.4.1.4 TCF/Srf-abhängige Induktion von EGR-1 durch hMrgX1-Rezeptoren in transfizierten, primären Spinalganglienneuronen

Im Rahmen dieser Arbeit stand keine neuronale Zelllinie zur Verfügung, in welcher der hMrgX1-Rezeptor endogen exprimiert wird. Aus offensichtlichen ethischen Gründen war es auch nicht möglich, primäre hMrgX1-Rezeptor-positive Zellen aus humanen Spinalganglien zu isolieren. Um dennoch so nah wie möglich die zelluläre Umgebung des endogen exprimierten hMrgX1-Rezeptors widerzuspiegeln, wurde der hMrgX1-Rezeptor in primären Spinalganglienneuronen embryonaler Ratten transient exprimiert. Diese primären Zellen wurden von der Firma Innoprot als kryokonservierte Zellen bezogen (vgl. Abschnitt 4.1.6).

hMrgX1-vermittelte Signalwege in diesen Zellen sollten durch die Stimulation der Zellen mit BAM8-22 ausgelöst werden. Aber auch rMrgC-Rezeptoren antworten auf eine BAM8-22-Stimulation mit einem deutlichen Ca^{2+} -Signal (vgl. Abbildung 5.3). Daher musste zunächst analysiert werden, ob die genutzten primären Spinalganglienneurone endogen rMrgC-Rezeptoren exprimieren. In Vorversuchen wurde die Transfektionseffizienz der primären Spinalganglienneurone überprüft. Nach verschiedenen Optimierungsschritten wurde schließlich ein Transfektionseffizienz von bis zu 5 % erreicht, so dass Ca^{2+} -Signale mit der deutlich sensitiveren Aequorin-Technik gemessen wurden (vgl. Abschnitt 4.2.3.2.1). Nach Transfektion der Zellen mit dem pG5A-Plasmid und Beladung mit Coelenterazin H wurde HBS-Puffer bzw. BAM8-22 injiziert und die entstehende Lumineszenz gemessen. Durch BAM8-22 konnte kein erhöhtes Ca^{2+} -Signal detektiert werden, was auf die fehlende Expression von rMrgC-

Ergebnisse

Rezeptoren hindeutet (Abbildung 5.65A). Da nach Stimulation mit Bradykinin ein deutliches Ca^{2+} -Signal von 54 ± 5 , vermutlich über endogen exprimierte B2R (Cesare, 1996) vermittelt, detektiert wurde, kann dieser Befund nicht durch technische Schwierigkeiten beispielsweise bei der Transfektion erklärt werden. Außerdem führte die Stimulation mit BAM8-22 in Spinalganglienneuronen (Abbildung 5.65B), die zusätzlich zu Aequorin auch den hMrgX1-Rezeptor transient exprimierten, zu einem sehr deutlichen Ca^{2+} -Signal von 27 ± 2 . Damit sollten BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Signale in diesen primären Spinalganglienneuronen nach einer hMrgX1-Expression nicht von rMrgC-Rezeptoren, sondern nur hMrgX1-abhängig vermittelt werden, womit sich dieses Zellsystem exzellent eignet, hMrgX1-vermittelte Signalwege zu analysieren.

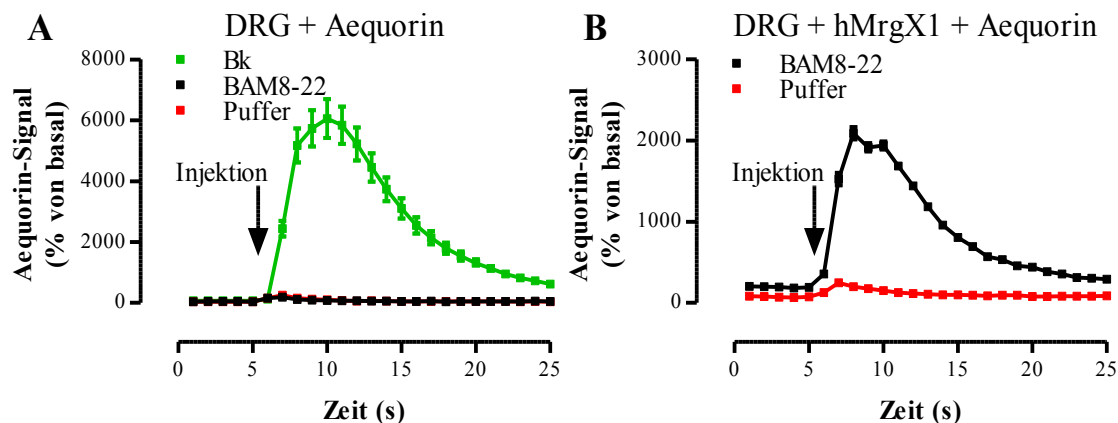


Abbildung 5.65: BAM8-22-induzierte Ca^{2+} -Signale in primären Spinalganglienneuronen

(A und B) Ca^{2+} -Signale in primären Spinalganglienneuronen (DRG) nach Transfektion von Aequorin (A) oder Aequorin und hMrgX1-Rezeptoren (B) und Beladung mit dem Aequorinsubstrat Coelenterazin H. Es wurde Puffer, BAM8-22 (2 μM) oder Bradykinin (Bk, 1 μM) injiziert. Es wurden 40 einzelne Stimulationen mit Zellen aus drei unabhängigen Transfektionen durchgeführt.

In F11-hMrgX1-Zellen wurde nach BAM8-22 Stimulation eine Aktivierung eines TCF/Srf-abhängigen Reporters identifiziert (vgl. Abbildung 5.60), welche durch den Erk-1/2-Inhibitor PD184352 deutlich blockiert wurde. Daher sollte nun zunächst dieser Reporter auch in den primären Spinalganglienneuronen analysiert werden. Nach Expression des hMrgX1-Rezeptors und des 5xSRE-Luz-Vektors wurden die Zellen mit BAM8-22 (2 μM) stimuliert und nach 8 Stunden wurde die Luziferaseaktivität bestimmt (Abbildung 5.66). Es zeigte sich eine deutliche BAM8-22-induzierte Erhöhung der Luziferaseaktivität ($1,7 \pm 0,05$ -fach), die durch vorherige Behandlung mit PD184352 deutlich reduziert werden konnte ($0,3 \pm 0,06$ -fach bzw. $0,6 \pm 0,05$ -fach für PD184352-behandelte Zellen mit oder ohne BAM8-22-Stimulation). Damit konnte die hMrgX1-vermittelte Regulation transkriptioneller Aktivität auch in primären Spinalganglienneuronen bestätigt werden. Außerdem kann die BAM8-22-induzierte Erk-1/2-abhängige Aktivierung des TCF/Srf-abhängigen Reporters als gesichert gelten, da sie sowohl in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen, als auch in hMrgX1-Rezeptor transient-exprimierenden, primären Spinalganglienneuronen gefunden wurde.

Ergebnisse

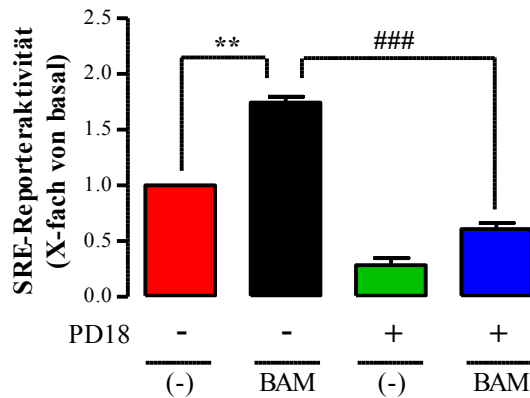


Abbildung 5.66: hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 5xSRE-Luz-Vektors in primären Spinalganglienneuronen über Erk-1/2

SRE-Reporteraktivität in primären Spinalganglienneuronen nach transienter Expression des hMrgX1-Rezeptors und Stimulation für 8 Stunden mit BAM8-22 (BAM, 2 μ M). Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit PD184352 (PD18, 10 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. In jedem Experiment wurde die Luziferase-abhängige Lichtemission von stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen und auf den jeweiligen basalen Wert normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

Nach der Verifizierung der hMrgX1-vermittelten SRE-Aktivierung sollte auch nach konkreten TCF/Srf-abhängigen Genen gesucht werden, die durch die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors induziert werden. Dabei fiel die Wahl auf das EGR-1-Gen, da dessen BAM8-22-vermittelte Induktion auf Proteinebene in F11-hMrgX1-Zellen bestätigt werden konnte.

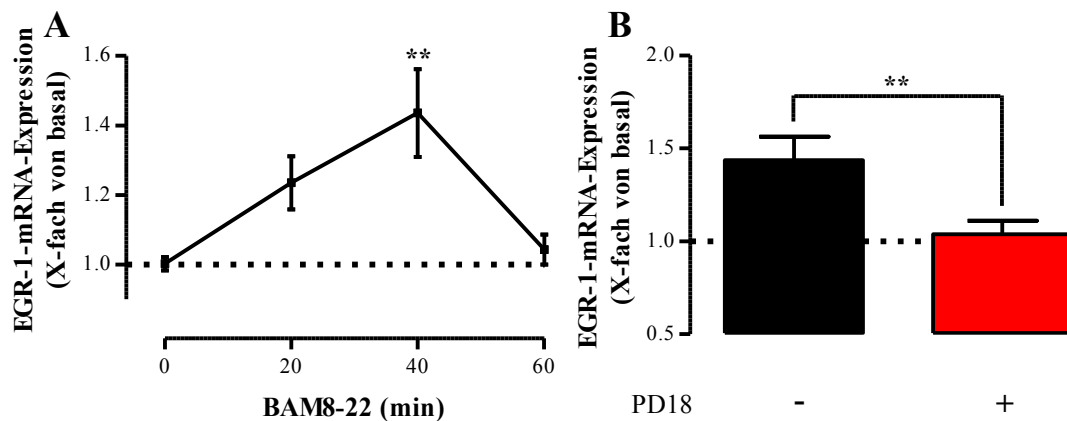


Abbildung 5.67: hMrgX1-vermittelte EGR-1-Induktion in primären Spinalganglienneuronen über Erk-1/2

(A und B) Relative mRNA-Expression von EGR-1 in primären Spinalganglienneuronen nach Stimulation mit BAM8-22 (2 μ M). In (A) wurde die Stimulationszeit variiert, während in (B) die Zellen 30 Minuten vor der 40-minütigen Stimulation mit PD184352 (PD18, 10 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorbehandelt wurden. Die relative EGR-1-Expression wurde mittels quantitativer PCR bestimmt, indem auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta$ Cp-Methode normiert wurde. Es wurden vier unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Zunächst wurde eine Stimulationskinetik durchgeführt, um den optimalen Zeitpunkt für die potentielle EGR-1-Induktion zu identifizieren. In Abbildung 5.67A zeigt sich, dass die Menge der EGR-1-mRNA durch BAM8-22 langsam erhöht wurde, nach 40

Minuten ein Maximum erreichte, um danach relativ schnell wieder auf das basale Expressionsniveau zurückzufallen. Da die EGR-1-Induktion ($1,4 \pm 0,1$ -fach) nach einer Stimulationszeit von 40 Minuten durch die Vorbehandlung mit dem Erk-1/2-Inhibitor PD184352 vollständig blockierbar war ($1,0 \pm 0,1$ -fach), konnte ein zusätzlicher, prinzipieller Nachweis hMrgX1-vermittelter Genregulation geliefert werden (Abbildung 5.67B). Außerdem konnte damit der komplette EGR-1-induzierende Signalweg aus F11-hMrgX1-Zellen in primären Spinalganglienneuronen reproduziert werden. Dieser Befund stellt eine zusätzliche Übereinstimmung zwischen F11-Zellen und primären Spinalganglienneuronen dar, womit die Einsetzbarkeit dieses Zellsystems für die Analyse von Signalwegen aus Spinalganglienneuronen weiter etabliert wird.

5.4.2 Ca^{2+} -abhängige Genregulation

5.4.2.1 hMrgX1-vermittelte Aktivierung eines NFAT-abhängigen Reportergenkonstruktes in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen

Seit 1999 ist bekannt, dass der Ca^{2+} /Calcineurin-aktivierte Transkriptionsfaktor *nuclear factor of activated t-cells* (NFAT) auch in Neuronen von Bedeutung ist (Graef, 1999), während NFAT-Funktionen bis dahin im Immunsystem analysiert worden sind. Neben der artifiziellen Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Lösungen mit hoher K^{+} -Konzentration, Ionomycin oder elektrische Aktivierung von spannungsgesteuerten Ca^{2+} -Kanälen (Graef, 1999, Jung, 2008a, Kim, 2009a) ist kürzlich auch eine NFAT-Aktivierung durch zwei GPCR in Neuronen beschrieben worden (Jackson, 2007, Seybold, 2006).

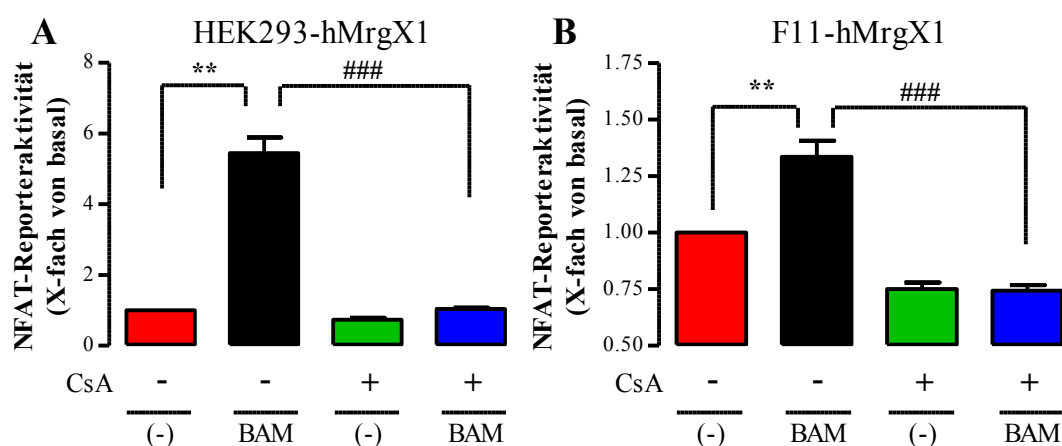


Abbildung 5.68: hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 4xNFAT-Re-Luz-Vektors in F11-hMrgX1-Zellen über Calcineurin

(A und B) NFAT-Reporteraktivität in HEK293-hMrgX1- (A) oder F11-hMrgX1-Zellen (B) nach Stimulation für 6 Stunden mit BAM8-22 (BAM, 1 μM). Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (CsA, 1 μM) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. In jedem Experiment wurde die Luziferase-abhängige Lichtemission von stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen und auf den jeweiligen basalen Wert normiert. Es wurden vier unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Daher sollte im Weiteren der Möglichkeit einer hMrgX1-vermittelten Aktivierung von NFAT-abhängiger Transkription nachgegangen werden. Um diese Möglichkeit prinzipiell zu verifizieren, wurde wiederum ein Reportergenkonstrukt eingesetzt, in dem die Expression des Luziferasegens durch die Bindung von vier NFAT-Molekülen an den Promoter deutlich gesteigert werden kann (vgl. Tabelle 4.3). Der p4xNFAT-Re-Luz-Vektor wurde daher in HEK293-hMrgX1- oder F11-hMrgX1-Zellen transfiziert und die Zellen wurden mit BAM8-22 für 6 Stunden stimuliert. Dabei ergab sich sowohl in HEK293-hMrgX1- ($5,5 \pm 0,4$ -fach) als auch in F11-hMrgX1-Zellen ($1,3 \pm 0,07$ -fach) eine signifikante Induktion der Luziferase (Abbildung 5.68). Der Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A wurde für 30 Minuten vor der Stimulation mit den Zellen inkubiert, um die Dephosphorylierung von NFAT und die daraus resultierende transkriptionelle Aktivierung durch nukleären Import zu blockieren. Aus dieser Behandlung resultierte in beiden Zelllinien die praktisch komplette Inhibition der BAM8-22-vermittelten Erhöhung der Luziferaseaktivität (Abbildung 5.68), so dass der hMrgX1-Rezeptor in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen über die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration die Phosphatase Calcineurin aktiviert, die wiederum NFAT dephosphoryliert und damit transkriptionell aktiviert. Damit konnte neben der Induktion TCF/Srf-abhängiger Transkription ein weiterer Transkriptionsfaktor identifiziert werden, über den hMrgX1-Rezeptoren die Genregulation modulieren können.

5.4.2.2 Induktion NFAT-abhängiger Gene durch hMrgX1-Rezeptoren in F11-hMrgX1-Zellen

Zurzeit sind fünf verschiedene NFAT-Isoformen bekannt, von denen vier durch Calcineurin aktiviert werden (Nguyen, 2008). Um nachfolgend die Induktion konkreter NFAT-abhängiger Gene zu analysieren, sollte daher zunächst geklärt werden, welche NFAT-Isoformen in F11-hMrgX1-Zellen exprimiert werden. In Abbildung 5.69 (rote Balken) ist zu erkennen, dass NFATc1 und NFATc3 vorherrschend exprimiert werden, so dass die hMrgX1-induzierten Effekte möglicherweise von diesen beiden NFAT-Isoformen vermittelt werden. Dieses relative Expressionsmuster stimmt beachtenswerterweise mit anderen Daten überein und wurde so auch in primären Spinalganglienneuronen gefunden (Jung, 2008a).

Theoretisch könnte die Aktivierung des NFAT-abhängigen Reporters auch über eine Induktion der NFAT-Proteinexpression erklärbar sein, da so die totale basale Aktivität NFAT-abhängiger Transkription gesteigert werden könnte. Daher wurde die Expression der Calcineurin-abhängigen NFAT-Isoformen auch nach einer 6-stündigen BAM8-22-Stimulation mittels quantitativer PCR untersucht. In Abbildung 5.69 ist zu erkennen, dass die Stimulation der hMrgX1-Rezeptoren bei keiner der vier NFAT-Isoformen zu einer modulierten mRNA-Expression führte, womit diese Erklärungsmöglichkeit ausgeschlossen und vielmehr von einer transkriptionellen

Ergebnisse

Aktivierung über die Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration und nachfolgenden Aktivierung von Calcineurin ausgegangen werden kann.

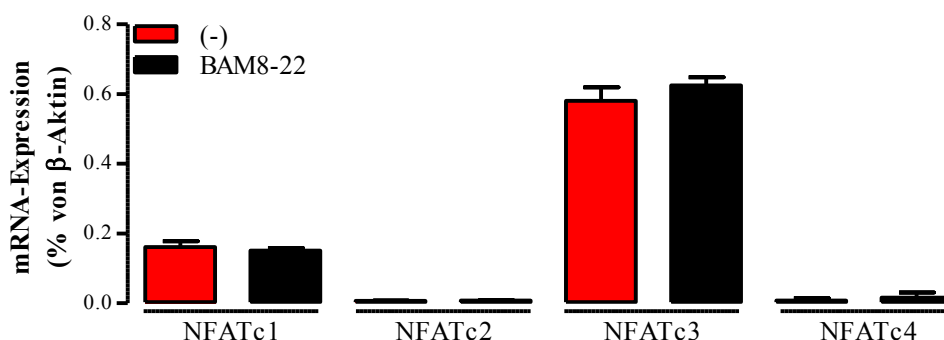


Abbildung 5.69: Expression Calcineurin-abhängiger NFAT-Isoformen in F11-hMrgX1-Zellen

Relative mRNA-Expression von NFATc1-4 in F11-hMrgX1-Zellen. Einige Zellen wurden für 6 Stunden mit BAM8-22 (1 μM) stimuliert. Die NFAT-Expression wurde mittels quantitativer PCR bestimmt, indem auf die β -Aktin-Expression normiert wurde, ohne die $\Delta\Delta\text{Cp}$ -Methode anzuwenden. Es wurden drei unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Ausgehend von einer Literaturrecherche wurde eine Auswahl an NFAT-abhängigen Genen getroffen, deren transkriptionelle Modulation durch den hMrgX1-Rezeptor nachfolgend analysiert werden sollte. Dabei wurde darauf geachtet, dass ein entsprechendes Gen in einem neuronalen Zelltyp zumindest auf mRNA-Ebene NFAT-abhängig induziert wurde. Letztendlich setzte sich die erarbeitete Liste aus einer Isoform des IP_3R (IP_3R -1), aus dem Chemokinrezeptor 2 (CCR2), aus der Cyclooxygenase 2 (COX-2) sowie aus dem Neurotrophin *brain-derived neurotrophic factor* (BDNF) zusammen (Genazzani, 1999, Groth, 2007, Groth, 2003, Jackson, 2007, Jung, 2008a).

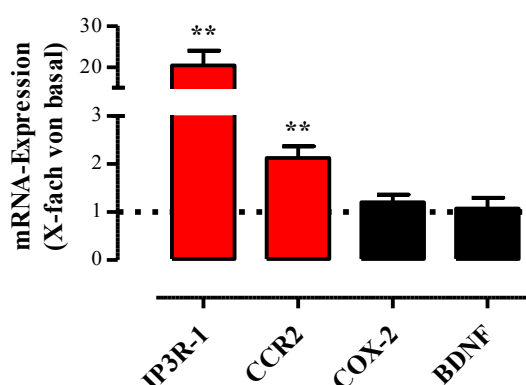


Abbildung 5.70: Induktion NFAT-abhängiger Gene in F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22

Relative mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 (6 h, 1 μM). Die relative Expression von vier Genen wurde mittels quantitativer PCR bestimmt, indem die Expression des jeweiligen Zielgens auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta\text{Cp}$ -Methode normiert wurde. Signifikant induzierte Gene sind mit einem roten Balken gekennzeichnet. Es wurden drei unabhängige cDNA-Proben analysiert.

F11-hMrgX1-Zellen wurden für 6 Stunden mit BAM8-22 stimuliert, bevor die totale RNA dieser Zellen isoliert und in cDNA revers transkribiert wurde. In der quantitativen PCR ergab sich ein interessantes Bild, da der IP_3R -1 und der CCR2 durch

die BAM8-22-Stimulation auf mRNA-Ebene induziert wurden, während die Expression von COX-2 und BDNF unverändert blieb (Abbildung 5.70). Damit konnten der prinzipiell möglichen Transkriptionsregulation über NFAT zwei konkrete Gene zugeordnet werden, die durch den hMrgX1-Rezeptor induziert werden.

Der IP3R-1 stellt in Neuronen das vielleicht etablierteste NFAT-Zielgen dar. So wurde die NFAT-abhängige Induktion des IP3R-1 bereits in Neuronen des Hippocampus, Rückenmarks, Spinalganglions und Kleinhirns nachgewiesen (Genazzani, 1999, Groth, 2003). Allerdings konnte dieser Induktion bisher noch keine physiologische oder pathophysiologische Bedeutung zugeordnet werden, so dass die Konsequenz der IP3R-1-Induktion bislang unklar blieb. Hier sollte zunächst verifiziert werden, dass die IP3R-1-Induktion über die Aktivierung von NFAT vermittelt wird. Dafür wurde wiederum Cyclosporin A eingesetzt, um die NFAT-Aktivierung zu blockieren (Abbildung 5.71). Diese Behandlung führte zu einer dramatischen Verringerung der hMrgX1-induzierten IP3R-1-Induktion von 21 ± 4 -fach auf 2 ± 1 -fach, womit auch in F11-hMrgX1-Zellen die IP3R-1-Induktion über NFAT abläuft.

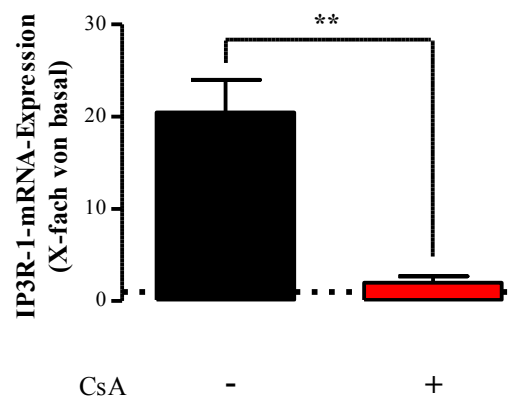


Abbildung 5.71: hMrgX1-vermittelte IP3R-1-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen über NFAT

Relative IP3R-1-mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 (6 h, 1 μ M). Die relative Expression wurde mit quantitativer PCR bestimmt, indem die Expression des IP3R-1 auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta$ Cp-Methode normiert wurde. Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. Es wurden drei unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Eine NFAT-abhängige CCR2-Induktion wurde bisher lediglich auf mRNA-Ebene beschrieben (Jung, 2008a), nachdem in F11-Zellen oder primären Spinalganglieneuronen die intrazelluläre Ca^{2+} -Konzentration durch Ionomycin oder K^{+} -vermittelte Depolarisation erhöht wurde. Physiologischere Stimuli, insbesondere GPCR-Agonisten, sind bislang nicht als CCR2-Induktoren beschrieben worden. Daher war der hier beschriebene Befund der hMrgX1-vermittelten CCR2-Induktion besonders überraschend und so sollte auch hier zunächst die NFAT-Abhängigkeit verifiziert werden (Abbildung 5.72). Ebenso wie beim IP3R-1, verhindert Cyclosporin A die CCR2-Induktion durch den hMrgX1-Rezeptor, so dass die relative CCR2-mRNA-Expression von $2,1 \pm 0,2$ -fach auf $1,1 \pm 0,1$ -fach zurückging. Damit konnte der Signalweg, der bereits vorgeschlagen

Ergebnisse

worden ist (Jung, 2008a), in F11-hMrgX1-Zellen bestätigt und der hMrgX1-Rezeptor als bisher einziger physiologischer Induktor des CCR2 etabliert werden.

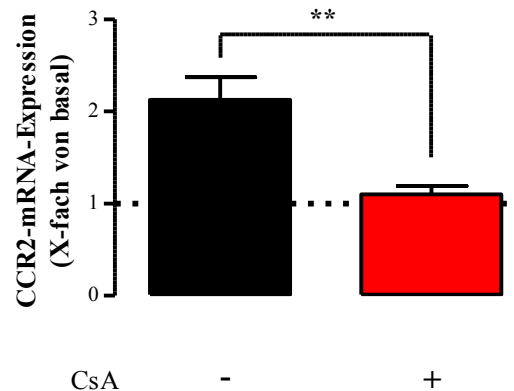


Abbildung 5.72: hMrgX1-vermittelte CCR2-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen über NFAT

Relative CCR2-mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 (6 h, 1 μ M). Die relative Expression wurde mit quantitativer PCR bestimmt, indem die Expression des CCR2 auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta C_p$ -Methode normiert wurde. Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. Es wurden fünf unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Dies ist im Kontext der Schmerzchronifizierung besonders erwähnenswert, da der CCR2 dort ein ganz zentrales Protein darstellt (White, 2005). In verschiedenen Studien konnte unter anderem nachgewiesen werden, dass die Entwicklung von neuropathischem Schmerz durch die Induktion des CCR2 in Spinalganglienneuronen mit ausgelöst und beschleunigt wird. So fand sich in CCR2-defizienten Mäusen ein deutlich vermindertes Schmerzverhalten in der späten Phase des Formalin-Testes sowie eine verminderte mechanische Allodynie, nachdem eine partielle Ligatur des Ischiasnervs gesetzt worden ist (Abbadie, 2003). Außerdem konnten CCR2-Antagonisten die Entwicklung von neuropathischem Schmerz blockieren (Bhangoo, 2007, Serrano, 2010) und es wurde deutlich, dass CCR2-vermittelte Signalweiterleitung im Spinalganglion und nicht im Rückenmark oder in verschiedenen Zellen des Immunsystems für die Entwicklung von neuropathischem Schmerz verantwortlich ist (Jung, 2009).

Aufgrund dieser herausragenden Bedeutung des CCR2 sollte der bisher vorliegende Befund auf mRNA-Ebene durch einen adäquaten Proteinnachweis verifiziert werden. Dafür wurde im Rahmen dieser Arbeit die Durchflusszytometrie genutzt, mit der die Expression des CCR2 auf der Ebene einzelner Zellen untersucht werden kann. F11-hMrgX1-Zellen wurden für 20 Stunden mit BAM8-22 stimuliert und nachfolgend wurde in intakten, nicht fixierten Zellen mittels eines APC-gekoppelten CCR2-Antikörpers (vgl. Abschnitt 4.1.4.2) die Expression des CCR2 an der Oberfläche der Zellen detektiert (vgl. Abschnitt 4.2.3.10). Dabei wurde durch geeignete Kontrollen Sorge getragen, dass die Antikörperfärbung nicht durch das selektive Vorhandensein toter Zellen verursacht werden kann (vgl. Abschnitt 4.2.3.10). In Abbildung 5.73 ist in einem repräsentativen Ergebnis gezeigt, dass nach BAM8-22-Stimulation 22,69 % der Zellen CCR2-positiv waren, während dieser Anteil in nicht stimuliertem Zustand nur 9,35 % betrug. Diese

Verschiebung ist an einem höheren rechtsseitigen Signal und einer gleichzeitigen Reduktion des linksseitigen Signals zu erkennen. In insgesamt fünf Experimenten führte die BAM8-22-Stimulation im Durchschnitt zu einer Erhöhung der Anzahl CCR2-positiver Zellen um $11 \pm 1 \%$ und war damit hoch-signifikant unterschiedlich gegen die getestete Nullhypothese, nämlich keine Veränderung der Anzahl CCR2-positiver Zellen. Damit wird die hMrgX1-vermittelte Induktion der CCR2-mRNA in eine vermehrte Proteinexpression umgesetzt und würde somit die Erwartung wecken, dass BAM8-22-stimulierte F11-hMrgX1-Zellen besser auf CCR2-Agonisten reagieren sollten.

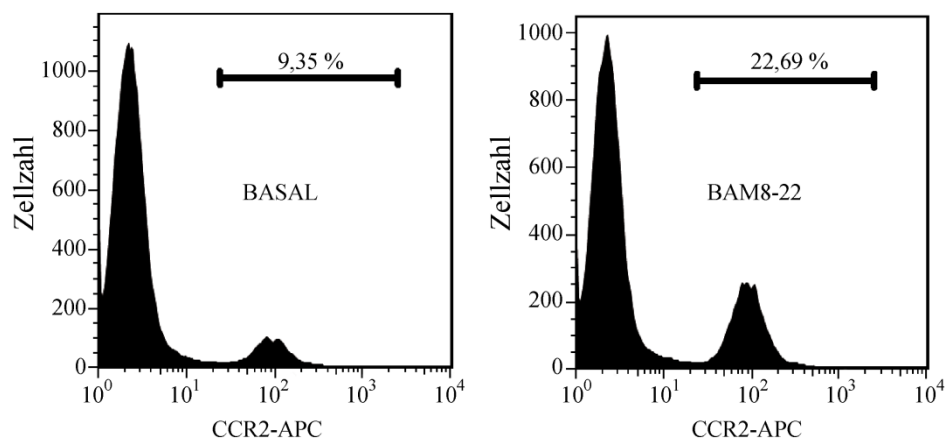


Abbildung 5.73: hMrgX1-vermittelte CCR2-Proteinexpression in F11-hMrgX1-Zellen

F11-hMrgX1-Zellen wurden mit BAM8-22 (1 μ M) für 20 Stunden (rechte Seite) oder nicht (linke Seite) stimuliert. Die CCR2-Expression an der Zelloberfläche wurde sodann in nicht fixierten Zellen durch einen APC-gekoppelten CCR2-Antikörper nachgewiesen und im Durchflusszytometer analysiert. Die Fluoreszenzintensität ist gegen die gemessene Zellzahl aufgetragen worden. Außerdem ist der prozentuale Anteil CCR2-positiver Zellen angegeben. Das gezeigte Ergebnis ist repräsentativ für fünf unabhängige Experimente mit vergleichbaren Befunden. Durchschnittlich ergab sich eine Zunahme an CCR2-positiven Zellen durch die Stimulation mit BAM8-22 von $10,8 \pm 1,4 \%$.

Der CCR2 wird von verschiedenen Chemokinen aktiviert, die vor Einführung der systematischen Nomenklatur als Gruppe der *monocyte chemoattractant proteins* (MCP) bezeichnet wurden (Murphy, 2000). Innerhalb dieser Gruppe ist MCP-1 (CCL2) der spezifische CCR2-Agonist, der seine Wirkung also nur über den CCR2 vermitteln kann (Murphy, 2002). Damit ist CCL2 sehr gut geeignet, um hoch-spezifisch CCR2-abhängige Signaltransduktionsprozesse zu untersuchen. Der CCR2 ist ein $G_{i/o}$ -koppelnder GPCR, der nach der Bindung von CCL2 AC inhibiert (Myers, 1995) und zu einer Aktivierung der Erk-1/2 führt (Ashida, 2001). Im Folgenden sollten sowohl die Inhibition der AC, als auch die Aktivierung der Erk-1/2 durch den spezifischen CCR2-Agonisten CCL2 vergleichend in nicht stimulierten und BAM8-22-stimulierten F11-hMrgX1-Zellen untersucht werden.

Die AC-Aktivität wurde in dieser Arbeit über den Nachweis von radioaktiv markiertem cAMP bestimmt (vgl. Abschnitt 4.2.3.9). Da die Inhibition der AC unter basalen Bedingungen nur schwer nachweisbar ist, wird die AC-Aktivität durch die Gabe von FSK erhöht, um dann den inhibierenden Effekt eines $G_{i/o}$ -koppelnden GPCR

Ergebnisse

nachzuweisen (Breit, 2006a). F11-hMrgX1-Zellen wurden für 20 Stunden mit BAM8-22 stimuliert oder nicht stimuliert. Nach dieser Stimulationszeit wird die Lösung von den Zellen gewaschen und die Zellen werden für 30 Minuten mit FSK stimuliert, wobei in einigen Proben CCL2 zugesetzt wurde, um den CCR2 zu aktivieren. In Abbildung 5.74A ist die gemessene Radioaktivität in den so generierten Proben aus einem repräsentativen Experiment dargestellt. Zunächst wird sichtbar, dass die Stimulation der Zellen mit FSK sowohl bei nicht vorstimulierten Zellen (4061 ± 110 Zerfälle pro Minute) als auch in BAM8-22-vorstimulierten Zellen (4038 ± 91 Zerfälle pro Minute), zu einer deutlichen cAMP-Akkumulation gegenüber nicht stimulierten Zellen (314 ± 36 bzw. 305 ± 39 Zerfälle pro Minute) führte. Dabei ist darauf hinzuweisen, dass die vorherige BAM8-22-Stimulation weder die basale noch die FSK-induzierte cAMP-Produktion modulierte.

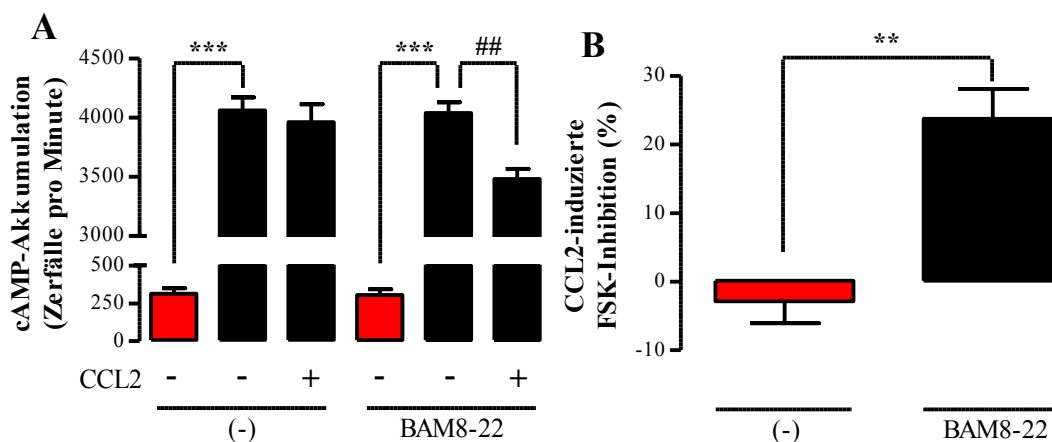


Abbildung 5.74: hMrgX1-induzierte CCL2-Sensitivität in F11-hMrgX1-Zellen (cAMP-Akkumulation)

(A) cAMP-Akkumulation in F11-hMrgX1-Zellen nach vorheriger Stimulation mit BAM8-22 (20 h, 1 μ M). Die Zellen wurden nicht stimuliert (rote Balken) oder für 30 Minuten mit FSK (5 μ M, schwarze Balken) mit oder ohne gleichzeitiger Gabe von CCL2 (100 ng/ml) stimuliert. Dargestellt sind die gemessenen Zerfälle pro Minute eines in Quadruplikaten durchgeführten repräsentativen Experimentes. (B) Die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Befunden wurden zusammengefasst und normiert, indem die absolute FSK-induzierte Zunahme der Zerfälle pro Minute berechnet sowie die CCL2-vermittelte Abnahme dieses Wertes in % ausgedrückt wurde.

Interessanterweise konnte CCL2 nur in BAM8-22-vorstimulierten F11-hMrgX1-Zellen einen inhibierenden Effekt auf die cAMP-Akkumulation ausüben (3480 ± 87 Zerfälle pro Minute), in den nicht vorstimulierten Zellen war dieser Effekt jedoch nicht messbar (3960 ± 153 Zerfälle pro Minute). Der so beschriebene Versuch wurde insgesamt fünfmal durchgeführt und als CCL2-induzierte Inhibition des FSK-Effektes zusammenfassend dargestellt (Abbildung 5.74B). Dabei ergab sich eine durchschnittliche Inhibition von FSK von 24 ± 4 %, allerdings nur nach vorheriger Stimulation mit BAM8-22. Dieser Wert ist von der Größenordnung für einen $G_{i/o}$ -koppelnden GPCR in F11-Zellen zu erwarten. So führte die Stimulation der endogen exprimierten δ - oder μ -Opioidrezeptoren zu einer Inhibition der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation von 18 bis 32 % (Rothe, 2012). Somit konnte mit dem spezifischen Agonisten CCL2 nachgewiesen werden, dass über den hMrgX1-Rezeptor der CCR2 in F11-hMrgX1-

Zellen induziert wird und schließlich als funktioneller CCL2-Rezeptor die typische $G_{i/o}$ -abhängige Signaltransduktionskaskade aktivieren kann.

In einem letzten Schritt sollte schließlich noch die Aktivierung der Erk-1/2 über eine CCR2-abhängige Signaltransduktionskaskade untersucht werden. Nach dem gleichen Protokoll der Vorstimulation wurden F11-hMrgX1-Zellen für 20 Stunden mit BAM8-22 vorbehandelt, kurz gewaschen und schließlich mit CCL2 stimuliert, bevor die Phosphorylierung der Erk-1/2 im Immunoblot analysiert wurde. In Abbildung 5.75 ist zu erkennen, dass auch hier die Vorstimulation des hMrgX1-Rezeptors zur Ausbildung einer Sensitivität für CCL2 in F11-hMrgX1-Zellen führte. So ergab eine 5-minütige Stimulation mit CCL2 eine Erk-1/2-Phosphorylierung von 192 ± 22 % gegenüber nicht stimulierten Zellen, während CCL2 unter Kontrollbedingungen die Erk-1/2-Phosphorylierung nicht veränderte (100 ± 28 %). Dies ist durch die hMrgX1-vermittelte CCR2-Induktion zu erklären und damit ein weiterer Nachweis der funktionalen CCR2-Proteininduktion. Damit konnte mittels verschiedener Techniken in F11-hMrgX1-Zellen etabliert werden, dass der hMrgX1-Rezeptor über die Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT, möglicherweise vor allem der Isoformen NFATc1 und NFATc3, die Induktion des CCR2 auf mRNA- und Proteinebene vermittelt, was schließlich in einer Sensitivität der Zellen für den CCR2-Agonisten CCL2 resultiert.

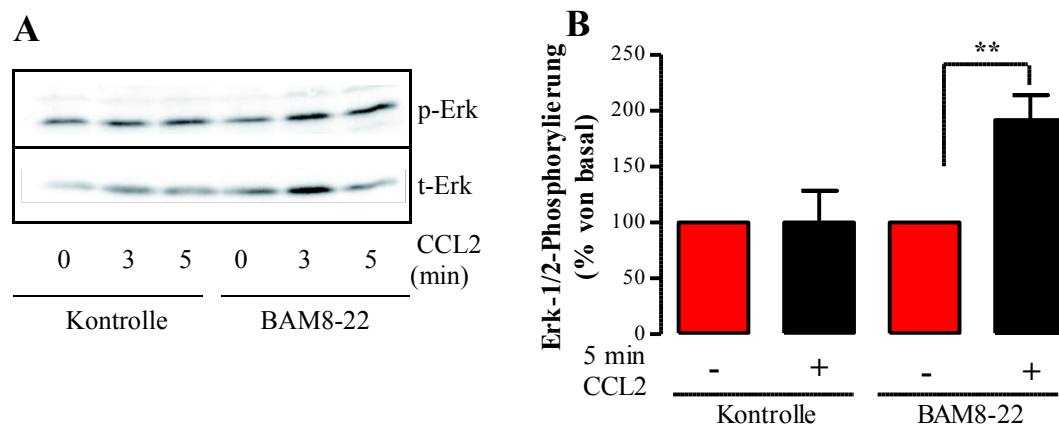


Abbildung 5.75: hMrgX1-induzierte CCL2-Sensitivität in F11-hMrgX1-Zellen (Erk-1/2-Phosphorylierung)

(A) Erk-1/2-Phosphorylierung in F11-hMrgX1-Zellen nach vorheriger Stimulation mit BAM8-22 (20 h, 1 μ M). Die Zellen wurden mit CCL2 (100 ng/ml) für unterschiedliche Zeiten stimuliert und anschließend lysiert. Die Erk-1/2-Phosphorylierung wurde dann durch Immunoblot mit dem p-Erk-1/2-Antikörper (p-Erk) analysiert. Danach wurde der p-Erk-1/2-Antikörper wieder von der Membran abgelöst und die Membran wurde zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelspuren mit dem Erk-2-Antikörper (t-Erk) inkubiert. (B) Quantifizierung der Erk-1/2-Phosphorylierung. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Schwärzung der p-Erk-1/2-Banden von nicht stimulierten und 5 Minuten mit CCL2 stimulierten Zellen (5 min CCL2) quantifiziert und diese Werte wurden auf die Schwärzung der Ladekontrolle Erk-2 normiert. Die so quantifizierten Daten wurden anschließend auf den jeweiligen Basalwert (0 min CCL2) bezogen. Es wurden drei unabhängige Experimente durchgeführt.

5.4.2.3 NFAT-abhängige Induktion von CCR2 durch hMrgX1-Rezeptoren in transfizierten, primären Spinalganglienneuronen

Nachdem interessante Daten einer Ca^{2+} /Calcineurin/NFAT-abhängigen Genregulation des hMrgX1-Rezeptors in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen generiert werden konnten, wurde auch für diesen neuen Signaltransduktionsweg, analog zu Abschnitt 5.4.1.4, eine Bestätigung der Daten in primären Spinalganglienneuronen angestrebt. In Abbildung 5.65 konnte bereits unter Beweis gestellt werden, dass die hier genutzten primären Spinalganglienneurone keine rMrgC-Rezeptoren endogen exprimieren und daher nur nach transients Expression des hMrgX1-Rezeptors auf BAM8-22 mit einem Ca^{2+} -Signal reagieren.

Somit wurde zunächst in hMrgX1-exprimierenden, primären Spinalganglienneuronen der p4xNFAT-Re-Luz-Vektor ko-transfiziert und die BAM8-22-induzierte Aktivierung des NFAT-Reporters analysiert (Abbildung 5.76). Die Stimulation der Zellen mit BAM8-22 führte zu einer signifikanten Erhöhung der Luziferaseaktivität ($1,5 \pm 0,02$ -fach), was durch die vorherige Behandlung mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A komplett blockiert werden konnte ($0,45 \pm 0,01$ -fach für CsA-behandelte Zellen mit oder ohne BAM8-22-Stimulation). Damit konnte die prinzipielle Fähigkeit, NFAT-abhängige transkriptionelle Prozesse zu regulieren, in primären Spinalganglienneuronen bestätigt werden. Insofern verhalten sich F11-hMrgX1-Zellen und primäre Spinalganglienneurone in Bezug auf die hMrgX1-vermittelte Genregulation gleichförmig. So konnte die TCF/Srf- und die NFAT-abhängige Reporteraktivierung in beiden Zellmodellen detektiert werden.

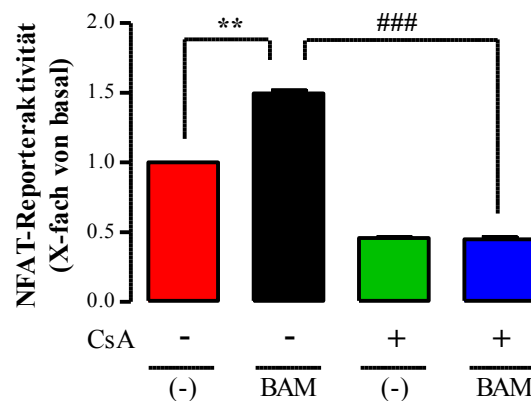


Abbildung 5.76: hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 4xNFAT-Re-Luz-Vektors in primären Spinalganglienneuronen über Calcineurin

NFAT-Reporteraktivität in primären Spinalganglienneuronen nach transients Expression des hMrgX1-Rezeptors und Stimulation für 8 Stunden mit BAM8-22 (BAM, $2 \mu\text{M}$). Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (CsA, $1 \mu\text{M}$) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. In jedem Experiment wurde die Luziferase-abhängige Lichtemission von stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen und auf den jeweiligen basalen Wert normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Mit diesem Befund sollte schließlich untersucht werden, ob auch die hMrgX1-vermittelte Induktion konkreter Gene über NFAT in primären Spinalganglienneuronen

nachweisbar ist. Aufgrund der bedeutsamen Rolle des CCR2 bei der Schmerzchronifizierung und dem in F11-hMrgX1-Zellen erbrachten funktionalen CCR2-Proteinnachweis, sollte daher die mRNA-Induktion des CCR2 in primären Spinalganglienneuronen analysiert werden. Dafür wurde der hMrgX1-Rezeptor transient exprimiert und die Zellen wurden für 6 Stunden mit BAM8-22 stimuliert (Abbildung 5.77). Es ergab sich analog zu F11-hMrgX1-Zellen eine hoch-signifikante Induktion der CCR2-mRNA ($2,1 \pm 0,2$ -fach). Da diese Induktion komplett durch den Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A blockiert werden konnte ($1,1 \pm 0,1$ -fach), wurde somit nicht nur die CCR2-Induktion durch den hMrgX1-Rezeptor, sondern auch die NFAT-abhängige transkriptionelle Regulation in primären Spinalganglienneuronen bestätigt.

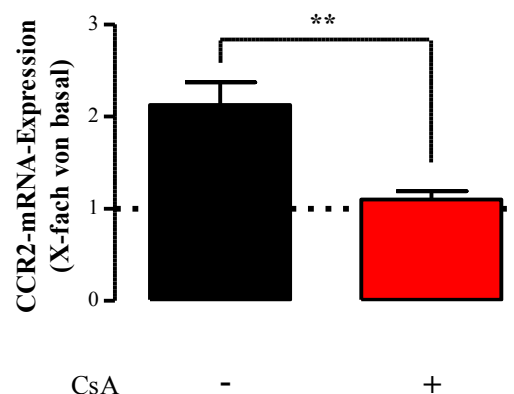


Abbildung 5.77: hMrgX1-vermittelte CCR2-Induktion in primären Spinalganglienneuronen über NFAT

Relative CCR2-mRNA-Expression in hMrgX1-Rezeptor transient-exprimierenden primären Spinalganglienneuronen nach Stimulation mit BAM8-22 (2 μ M, 6 h). Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0.1 %, keine Beschriftung) vorbehandelt. Die relative Expression des CCR2 wurde mittels quantitativer PCR bestimmt, indem auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta C_p$ -Methode normiert wurde. Es wurden fünf unabhängige cDNA-Proben analysiert.

5.4.2.4 CCR2-Induktion wird in F11-hMrgX1-Zellen nicht durch Bradykinin vermittelt

Bisher sind keine physiologischen Stimuli beschrieben worden, die zur Induktion des CCR2 in Spinalganglienneuronen führen. Das beinhaltet aber auch, dass negative Befunde, also Daten über eine nicht erfolgte CCR2-Induktion, obsolet sind. Mit dem interessanten Befund einer hMrgX1-vermittelten CCR2-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen und primären Spinalganglienneuronen über NFAT stellte sich daher die Frage, ob andere physiologische Stimuli ebenso zu einer CCR2-Induktion befähigt sind. Insbesondere war von Interesse, ob andere GPCR den CCR2 induzieren können. Bislang ist eine NFAT-Aktivierung nur für den B2R sowie den Neurokinin-1-Rezeptor (NK1R) beschrieben worden (Jackson, 2007, Seybold, 2006). Dabei wurden für den NK1R keine konkreten NFAT-Zielgene ermittelt, während über den B2R NFAT-abhängig COX-2 induziert wird. Da die endogene Expression des B2R in F11-hMrgX1-Zellen in dieser Arbeit schon

Ergebnisse

mehrfach beschrieben wurde (vgl. u. a. Abbildung 5.9 und Abbildung 5.25) und da Signaltransduktionswege, die in primären Spinalganglienneuronen für den B2R definiert wurden, auch in F11-hMrgX1-Zellen ablaufen (z. B. die TRPV1-Sensibilisierung), wurde im Rahmen dieser Arbeit überprüft, ob der B2R in der Lage ist, die Expression des CCR2 in F11-hMrgX1-Zellen zu induzieren.

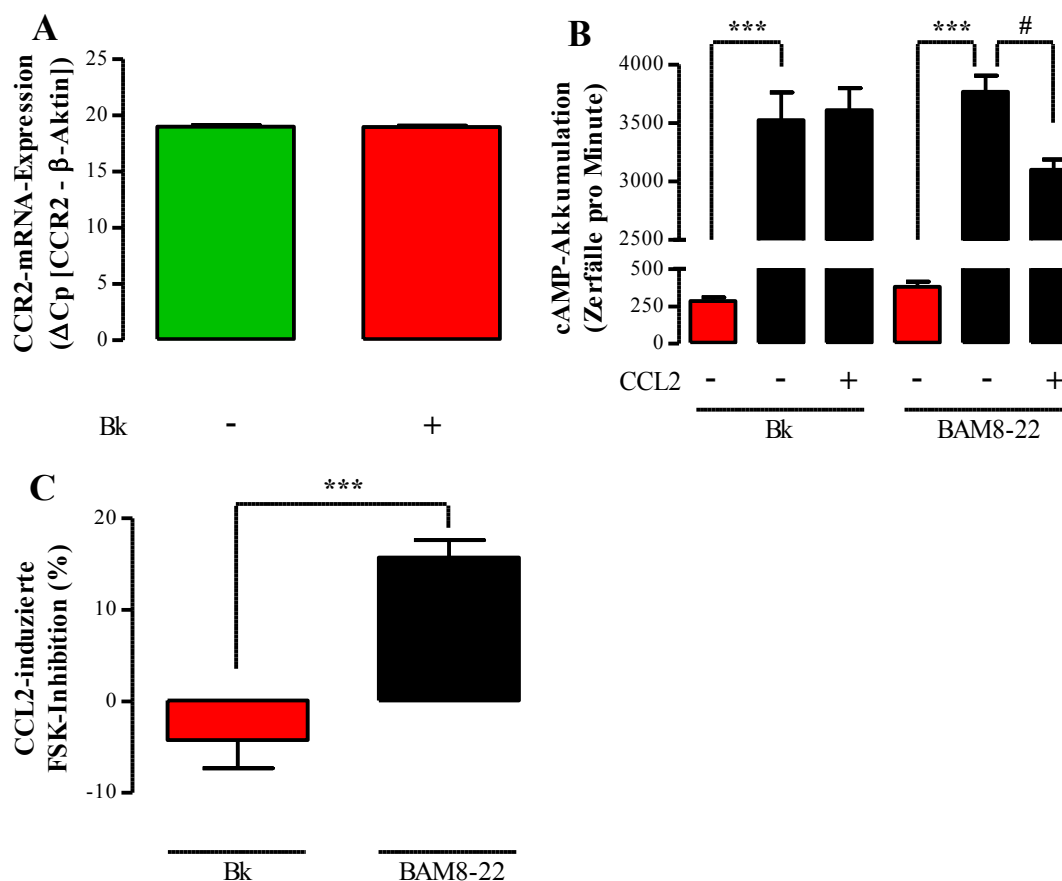


Abbildung 5.78: Keine B2R-vermittelte CCR2-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen

(A) CCR2-mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit Bradykinin (Bk, 1 μ M, 6 h). Die Expression des CCR2 wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und ist auf die β -Aktin-Expression normiert worden, indem die Differenz der C_p -Werte zwischen CCR2 und β -Aktin berechnet wurde. Es wurden vier unabhängige cDNA-Proben analysiert. (B) cAMP-Akkumulation in F11-hMrgX1-Zellen nach vorheriger Stimulation (20 h) mit BAM8-22 oder Bradykinin (Bk, beide 1 μ M). Die Zellen wurden nicht stimuliert (rote Balken) oder für 30 Minuten mit FSK (5 μ M, schwarze Balken) mit oder ohne gleichzeitiger Gabe von CCL2 (100 ng/ml) stimuliert. Dargestellt sind die gemessenen Zerfälle pro Minute eines repräsentativen Experimentes. (C) Die Ergebnisse aus fünf unabhängigen Experimenten mit vergleichbaren Befunden wurden zusammengefasst und normiert, indem die absolute FSK-induzierte Zunahme der Zerfälle pro Minute berechnet sowie die CCL2-vermittelte Abnahme dieses Wertes in % ausgedrückt wurde.

F11-hMrgX1-Zellen wurden daher für 6 Stunden mit Bradykinin stimuliert und die CCR2-Induktion wurde mittels quantitativer PCR analysiert. In Abbildung 5.78A ist deutlich zu erkennen, dass die Stimulation der F11-hMrgX1-Zellen mit Bradykinin keinen induzierenden Effekt auf das CCR2-mRNA-Expressionsniveau ausübte. So wurde in nicht stimulierten Zellen ein ΔC_p -Wert von $18,99 \pm 0,1$ ermittelt, während dieser Wert nach Stimulation mit Bradykinin $18,96 \pm 0,1$ betrug. Damit unterscheidet sich die

Ergebnisse

Signaltransduktionskapazität des B2R von derer des hMrgX1-Rezeptors in diesem Punkt deutlich.

Um diesen Unterschied weiter herauszuarbeiten, wurde der in Abschnitt 5.4.2.3 vorgestellte cAMP-Akkumulationsversuch nach vorheriger Stimulation mit BAM8-22 oder Bradykinin durchgeführt (Abbildung 5.78B). Während nach BAM8-22-Vorstimulation CCL2 zu einer Verminderung der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation von 3766 ± 139 Zerfällen pro Minute auf 3100 ± 87 Zerfälle pro Minute führte, konnte nach der vorherigen Stimulation mit Bradykinin keine messbare CCL2-induzierte Inhibition der FSK-vermittelten Effekte ermittelt werden (3525 ± 237 bzw. 3611 ± 187 Zerfälle pro Minute). In insgesamt fünf unabhängigen Versuchen resultierte nach BAM8-22-Vorstimulation eine CCL2-vermittelte Inhibition der FSK-induzierten cAMP-Akkumulation von 16 ± 2 %. Zum Vergleich bemaß der Bradykinin-vermittelte Effekt -4 ± 3 %. Somit konnte auf mRNA- und Proteinebene gezeigt werden, dass hMrgX1-Rezeptoren, nicht aber B2R, in der Lage sind, die Expression des CCR2 in F11-hMrgX1-Zellen zu induzieren.

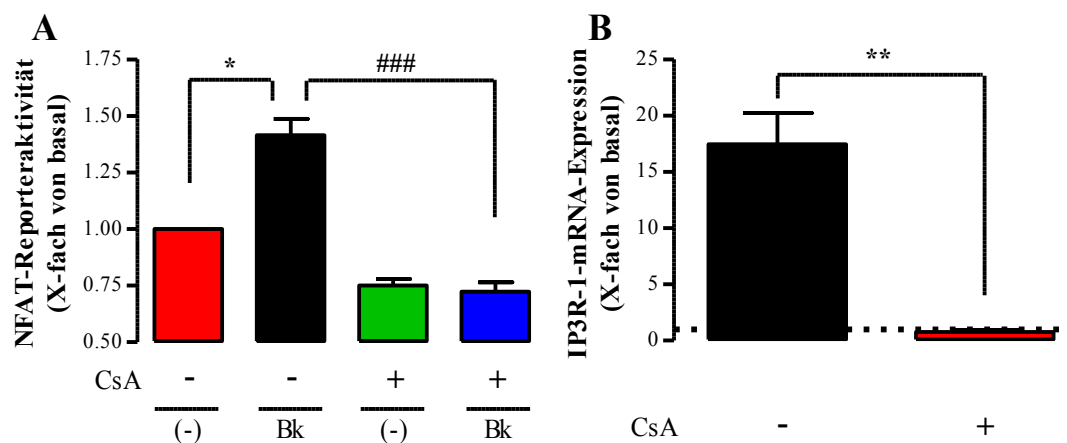


Abbildung 5.79: B2R-vermittelte Aktivierung des 4xNFAT-Re-Luz-Vektors und IP3R-1-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen über NFAT

(A) NFAT-Reporteraktivität in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation für 6 Stunden mit Bradykinin (Bk, 1 μ M). Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. In jedem Experiment wurde die Luziferase-abhängige Lichtemission von stimulierten und nicht stimulierten Zellen gemessen und auf den jeweiligen basalen Wert normiert. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt. (B) Relative IP3R-1-mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit Bradykinin (Bk, 6 h, 1 μ M). Die relative Expression wurde mit quantitativer PCR bestimmt, indem die Expression des IP3R-1 auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta$ Cp-Methode normiert wurde. Die Zellen wurden 30 Minuten vor der Stimulation mit Cyclosporin A (CsA, 1 μ M) oder der entsprechenden Menge DMSO (0,1 %, keine Beschriftung) vorinkubiert. Es wurden drei unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Mit diesem unerwarteten Befund stellte sich die Frage, ob ein molekularer Mechanismus für diesen Unterschied aufgezeigt werden kann. Daher wurde zunächst überprüft, ob der B2R das NFAT-abhängige Reportergenkonstrukt aktivieren bzw. andere NFAT-abhängige Gene induzieren kann. In Abbildung 5.79A ist zu sehen, dass eine 6-stündige Stimulation von F11-hMrgX1-Zellen mit Bradykinin zu einer deutlichen Induktion des NFAT-abhängigen Reporters führt ($1,4 \pm 0,1$ -fach), die zusätzlich auch

Ergebnisse

durch die vorherige Inkubation mit dem Calcineurin-Inhibitor Cyclosporin A komplett blockiert werden konnte. Außerdem wurde das etablierte NFAT-Zielgen IP3R-1, ebenso komplett Cyclosporin A-abhängig, durch Bradykinin induziert (Abbildung 5.79B). Somit kann ausgeschlossen werden, dass B2R *per se* nicht in der Lage sind, NFAT-abhängige Transkription zu induzieren. Interessanterweise muss darauf hingewiesen werden, dass die Bradykinin-induzierte Signalstärke sowohl des NFAT-abhängigen Reporters als auch der IP3R-1-Induktion, den jeweiligen BAM8-22-vermittelten Signalen gleicht (vgl. Abbildung 5.68 und Abbildung 5.71). Somit kann auch ausgeschlossen werden, dass eine geringere Bradykinin-induzierte NFAT-Aktivierung für die fehlende CCR2-Induktion verantwortlich ist. Es ist vielmehr davon auszugehen, dass die NFAT-Aktivierung durch BAM8-22 für die CCR2-Induktion notwendig, aber nicht ausreichend ist.

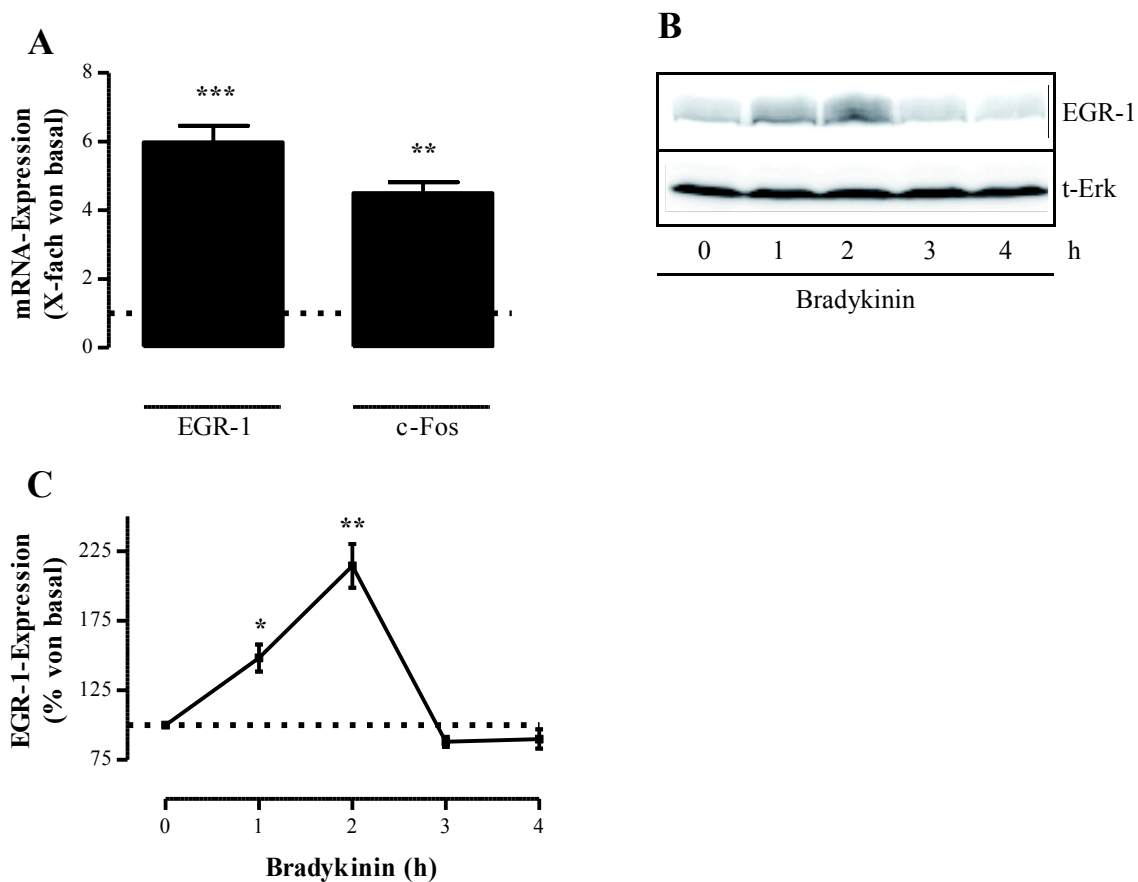


Abbildung 5.80: B2R-vermittelte Induktion von c-Fos und EGR-1 in F11-hMrgX1-Zellen

(A) Relative mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit Bradykinin (1 h, 1 μ M). Die relative Expression von zwei Genen wurde mittels quantitativer PCR bestimmt, indem die Expression des jeweiligen Zielgens auf die β -Aktin-Expression mittels der $\Delta\Delta$ Cp-Methode normiert wurde. Es wurden vier unabhängige cDNA-Proben analysiert. (B) F11-hMrgX1-Zellen wurden mit Bradykinin für unterschiedliche Zeiten mit einer Konzentration von 1 μ M stimuliert und anschließend lysiert. Die EGR-1-Expression wurde dann durch Immunoblot analysiert. Zur Kontrolle einer gleichmäßigen Beladung der einzelnen Gelspuren wurde die Membran nach dem Proteintransfer horizontal geschnitten und der untere Teil (Proteine bis 55 kDa) mit dem Erk-2-Antikörper (t-Erk) inkubiert. (C) Quantifizierung der EGR-1-Expression. Mittels densitometrischer Analyse wurde die Schwärzung der EGR-1-Bande quantifiziert und diese Daten wurden auf die Schwärzung in der Ladekontrolle Erk-2 normiert. Die so quantifizierten Daten wurden anschließend auf den jeweiligen Basalwert (0 h Bradykinin) bezogen. Es wurden vier unabhängige Experimente durchgeführt.

Dieser Annahme folgend müssen weitere Signaltransduktionskomponenten an der BAM8-22-vermittelten CCR2-Induktion beteiligt sein. NFAT-Isoformen sind Transkriptionsfaktoren, die ihre nukleären Funktionen in Heterodimeren wahrnehmen können. So ist in verschiedenen Zellen des Immunsystems die Heteromerisierung von NFAT-Isoformen sowohl mit EGR-1, als auch mit dem AP-1-Dimer aus c-Fos und c-Jun beschrieben worden (Ali, 2000, Decker, 2003, Lohoff, 2010). Diese Verbindung mit Transkriptionsfaktoren, die Erk-1/2-abhängig induziert werden können, erscheint vor dem Hintergrund der in Abschnitt 5.4.1 beschriebenen Aktivierung von TCF/Srf-abhängiger Transkription durch den hMrgX1-Rezeptor, insbesondere der Induktion von c-Fos und EGR-1, von großer Bedeutung. So wäre es beispielsweise möglich, dass hMrgX1-Rezeptoren die CCR2-Induktion durch die kooperative Aktivierung/Induktion von NFAT bzw. c-Fos oder EGR-1 vermitteln. Deshalb wurde nachfolgend untersucht, ob in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit Bradykinin ebenso wie nach einer BAM8-22-Stimulation erhöhte mRNA-Mengen von c-Fos und EGR-1 nachzuweisen sind (Abbildung 5.80A). Es zeigte sich, dass EGR-1 ($6,0 \pm 0,5$ -fach) und c-Fos ($4,5 \pm 0,3$ -fach) durch Bradykinin signifikant induziert werden. Außerdem konnte für das EGR-1-Gen gezeigt werden, dass die erhöhte mRNA-Menge in einer erhöhten Translation und damit mehr EGR-1-Protein resultiert (Abbildung 5.80B und C). Nach einer Stimulationszeit von 2 Stunden betrug die EGR-1-Proteinmenge beispielsweise 214 ± 16 % gegenüber jener in nicht stimulierten Zellen.

Somit muss konstatiert werden, dass weder eine fehlende EGR-1- noch eine fehlende c-Fos-Induktion durch Bradykinin für die nicht vorhandene CCR2-Induktion als Erklärung dienlich ist. Damit wird an diesem Punkt der Versuch, eine molekulare Erklärung für die distinkte CCR2-Induktion zwischen B2R und hMrgX1-Rezeptoren zu finden, nicht weiter verfolgt und es muss auf nachfolgende Studien verwiesen werden, die sich dieser Frage annehmen können.

5.4.3 Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten Genregulation

Im Rahmen dieser Arbeit konnte etabliert werden, dass der hMrgX1-Rezeptor in der Lage ist, die transkriptionelle Aktivität der Zelle zu modulieren. Dabei konnten unter Einsatz von verschiedenen Reportergenkonstrukten, quantitativer PCR, Immunoblot und funktionellen Versuchen zwei neue Signaltransduktionswege definiert werden (Abbildung 5.85).

Zum einen führt die Aktivierung des hMrgX1-Rezeptors zur Phosphorylierung der Erk-1/2, welche wiederum über Srf, höchst wahrscheinlich gemeinsam mit ELK-1, SRE aktivieren kann. Solche SRE sind beispielsweise in den Promotern von c-Fos oder EGR-1 enthalten. Zum anderen führt die Ca^{2+} -Mobilisation aus intrazellulären Speichern zur Aktivierung der Phosphatase Calcineurin, welche wiederum NFAT aktiviert. NFAT ist sodann in der Lage die Expression von IP3R-1 und CCR2 zu induzieren, wobei noch

Ergebnisse

nicht determinierte Ko-Faktoren, die durch B2R nicht aktiviert werden, beteiligt sein müssen. Nachdem in Abschnitt 5.3 bereits Signaltransduktionswege definiert werden konnten, die zur Auslösung einer akuten Schmerzempfindung nach der Aktivierung des hMrgX1-Rezeptors beitragen könnten, wurden damit hier Daten generiert, die dem hMrgX1-Rezeptor zusätzlich eine faszilatorische Rolle bei der Schmerzchronifizierung zuordnen.

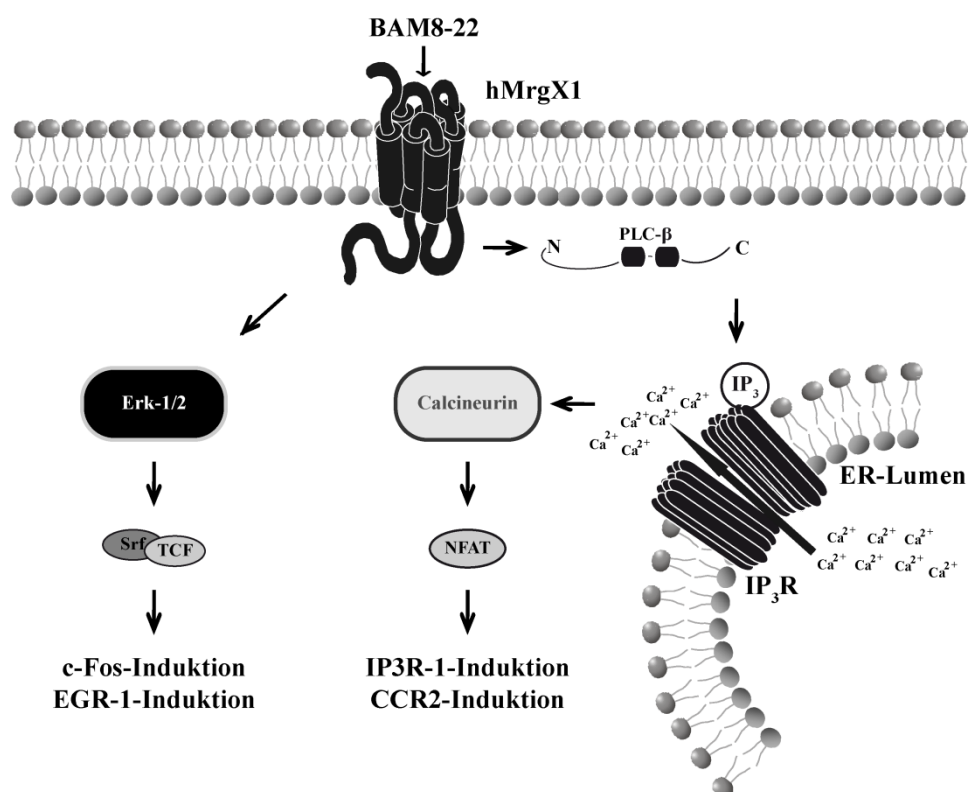


Abbildung 5.81: Graphische Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten Genregulation

Ausgehend von einer Stimulation des hMrgX1-Rezeptors mit seinem Agonisten BAM8-22 wird eine Modulation der Genexpression vermittelt. Zum Einen werden PLC-β-abhängig Ca²⁺-Ionen aus dem ER-Lumen freigesetzt, die die Proteinphosphatase Calcineurin aktivieren. Diese wiederum dephosphoryliert und aktiviert den Transkriptionsfaktor NFAT, aus dessen Aktivierung eine erhöhte Transkription von CCR2 und IP3R-1 resultiert. Zum anderen werden die Proteinkinasen Erk-1/2 durch den hMrgX1-Rezeptor aktiviert. Dies wiederum resultiert in der Aktivierung eines TCF, höchst wahrscheinlich ELK-1, der gemeinsam mit Srf die Transkription von c-Fos und EGR-1 stimuliert.

5.5 hMrgX1-vermittelte CCL2-Produktion in LAD2-Zellen

5.5.1 Funktionelle Proteinexpression des hMrgX1-Rezeptors in LAD2-Mastzellen

Ursprünglich wurde hMrgX1-Rezeptoren eine exklusive Expression in nozizeptiven Spinalganglienneuronen zugeschrieben (Dong, 2001, Lembo, 2002). Kürzlich wurde zusätzlich eine Expression in humanen Mastzellen vorgeschlagen (Subramanian, 2011b, Tatemoto, 2006). In diesen beiden Arbeiten wurden mittels reverser-Transkriptase-PCR Transkripte des hMrgX1-Rezeptors in induzierten Mastzellen vom Bindegewebstyp nachgewiesen, welche über mehrere Wochen aus *cluster of differentiation 3*-positiven Vorläuferzellen des Nabelschnurblutes unter Zusatz von SCF und Interleukin 6 generiert wurden. Zusätzlich zu diesem Befund gelang der mRNA-Nachweis ebenso in der Mastzelllinie LAD2, welche aus einer humanen Knochenmarksbiopsie von einem Patienten mit Mastozytose als Zelllinie etabliert wurde (Kirshenbaum, 2003). Über den Nachweis der hMrgX1-mRNA hinaus konnten in beiden Arbeiten allerdings keine weiteren Daten, vor allem keine Verifizierung der hMrgX1-Proteinexpression oder Funktion, geliefert werden.

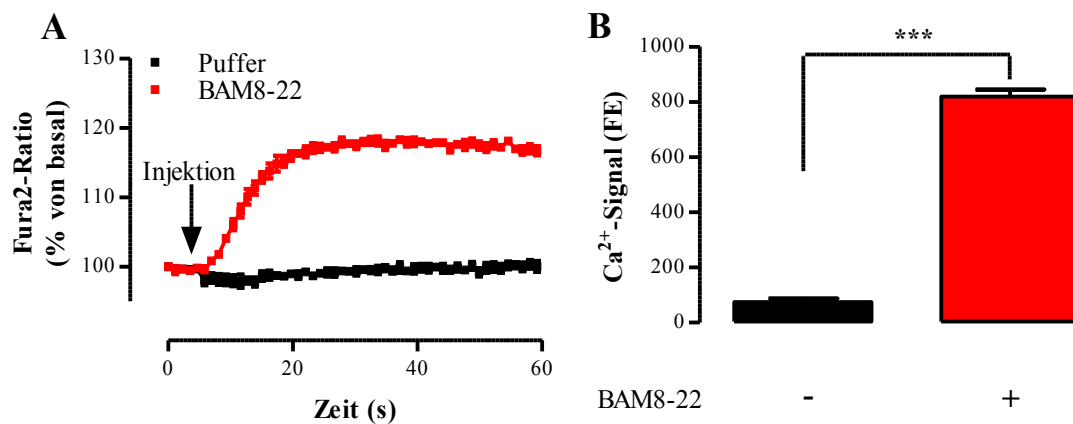


Abbildung 5.82: Ca²⁺-Signale in LAD2-Zellen

(A) Ca²⁺-Signale in LAD2-Zellen nach Beladung mit Fura2-AM und Injektion von Puffer oder BAM8-22 (5 μ M). (B) Das Ca²⁺-Signal aus (A) wurde quantifiziert und ist als Balkendiagramm in Flächeneinheiten (FE) dargestellt. Es wurden drei unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Nachdem Dr. Kirshenbaum von den *National Institutes of Health* in Bethesda (USA) bereit war, die LAD2-Zelllinie dem Walther-Straub-Institut zur Verfügung zu stellen, sollte daher zunächst ein spezifischer Nachweis der endogenen hMrgX1-Proteinexpression in diesen Zellen erbracht werden. Daher wurden LAD2-Zellen mit Fura2-AM beladen und Ca²⁺-Signale nach Stimulation mit dem hMrgX1-spezifischen Agonisten BAM8-22 gemessen. In Abbildung 5.82 ist zu erkennen, dass durch Gabe von 5 μ M BAM8-22 ein deutliches Ca²⁺-Signal ausgelöst wurde. Dabei ergab sich ein

BAM8-22-vermitteltes Ca^{2+} -Signal von 819 ± 26 , welches den Effekt von HBS-Puffer (74 ± 13) hoch-signifikant übertraf. Somit konnte der erste funktionelle hMrgX1-Proteinnachweis in einem nicht neuronalen, endogenen Expressionssystem geliefert werden.

5.5.2 hMrgX1-vermittelte CCL2-Ausschüttung aus LAD2-Mastzellen

Nachdem in Abschnitt 5.4 die CCR2-induzierende Rolle des hMrgX1-Rezeptors in Spinalganglienneuronen etabliert werden konnte und die bedeutsame Rolle des CCR2 im Zuge der Schmerzchronifizierung etabliert ist (White, 2005), stellte sich weiterhin die Frage, ob der hMrgX1-Rezeptor auch an der Produktion des CCR2-Agonisten CCL2 beteiligt sein könnte.

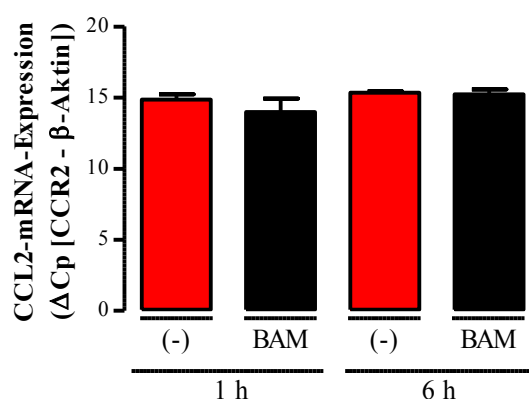


Abbildung 5.83: Keine hMrgX1-vermittelte CCL2-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen

CCL2-mRNA-Expression in F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit BAM8-22 (BAM, 1 μM) für 1 oder 6 Stunden. Die CCL2-Expression wurde mittels quantitativer PCR bestimmt und ist auf die β -Aktin-Expression normiert worden, indem die Differenz der Cp-Werte zwischen CCL2 und β -Aktin berechnet wurde. Es wurden vier unabhängige cDNA-Proben analysiert.

Eine Möglichkeit der neuronalen CCR2-Aktivierung wäre eine autokrine Schleife mit einer CCL2-Induktion in Spinalganglienneuronen. Daher wurde zunächst auf mRNA-Ebene determiniert, ob BAM8-22 in der Lage ist, die CCL2-Expression in F11-hMrgX1-Zellen zu steigern. In Abbildung 5.83 ist zu erkennen, dass weder nach 1 noch nach 6 Stunden Stimulation mit BAM8-22 signifikante Veränderungen der CCL2-mRNA-Menge in F11-hMrgX1-Zellen auftraten. So veränderte sich der ΔCp -Wert für CCL2 nach 6-stündiger Stimulation mit BAM8-22 von $15,34 \pm 0,1$ auf $15,23 \pm 0,4$. Damit scheint der hMrgX1-Rezeptor an einer potentiellen, autokrinen CCR2-Aktivierung in F11-hMrgX1-Zellen nicht beteiligt zu sein.

Mastzellen vom Bindegewebstyp stellen eine weitere CCL2-Quelle im peripheren Gewebe dar und können als mononukleäre Zellen klassifiziert werden, die im Gewebe ausdifferenzieren und dort ständig residieren (Galli, 2011). Sie sind häufig eng mit peripheren Nerven assoziiert und in der Lage, eine ganze Batterie von Mediatoren, u. a. CCL2, auszuschütten. Außerdem ist ihnen eine Funktion bei der Schmerzchronifizierung zugeordnet worden (Galli, 2011, Kulka, 2008, Zuo, 2003).

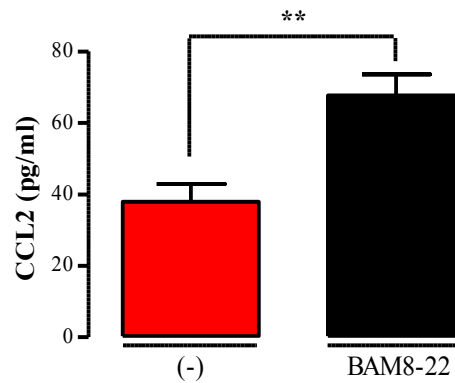


Abbildung 5.84: hMrgX1-vermittelte Induktion der CCL2-Produktion in LAD2-Zellen

CCL2-Produktion in Zellkulturüberständen von LAD2-Zellen nach Stimulation für 18 Stunden mit BAM8-22 (5 μ M). Zur Quantifizierung des ELISA-Signals wurden definierte Mengen an CCL2 in jedem Experiment mitgeführt, eine lineare Regression durchgeführt und die Menge an CCL2 im Zellkulturüberstand entsprechend berechnet. Es wurden vier unabhängige Experimente in Triplikaten durchgeführt.

Nach dem Nachweis der endogenen hMrgX1-Proteinexpression in LAD2-Zellen (Abschnitt 5.5.1) sollte daher der Frage nachgegangen werden, ob die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors in LAD2-Zellen zu einer CCL2-Ausschüttung führt. Zu diesem Zweck wurde ein ELISA der Firma R&D Systems (Wiesbaden) eingesetzt, welcher CCL2 in Zellkulturüberständen detektieren kann (vgl. Abschnitt 4.2.3.7). LAD2-Zellen wurden dafür 18 Stunden mit BAM8-22 stimuliert und der resultierende Zellkulturüberstand wurde im ELISA analysiert. In Abbildung 5.84 ist zu erkennen, dass die Stimulation der LAD2-Zellen mit BAM8-22 zu einer signifikanten Erhöhung der CCL2-Produktion von 38 ± 5 auf 68 ± 6 pg/ml führte. Zur Quantifizierung der produzierten Menge an CCL2 wurde in jedem Experiment eine Standardreihe mit rekombinantem CCL2 mitgeführt. Die durchschnittliche Erhöhung der CCL2-Produktion von 30 pg/ml (entspricht 30 nM) liegt in einem biologisch relevanten Bereich, da der EC_{50} -Wert des CCR2 mit etwa 10 nM angegeben wird (Combadiere, 1995). Damit konnte dem hMrgX1-Rezeptor in LAD2-Mastzellen eine neue Funktion zugewiesen werden, die vor allem im Zusammenhang mit der CCR2-Induktion in Spinalganglienneuronen von hoher Bedeutung sein könnte.

Zusammenfassend ergibt sich damit ein Bild, in dem der hMrgX1-Rezeptor in Spinalganglienneuronen und Mastzellen parallel zur Induktion bzw. Ausschüttung des Rezeptor-Liganden-Paares CCR2/CCL2 führt und somit an der Schmerzchronifizierung beteiligt sein könnte. Diese Zusammenhänge sind graphisch in Abbildung 5.85 zusammenfassend dargestellt.

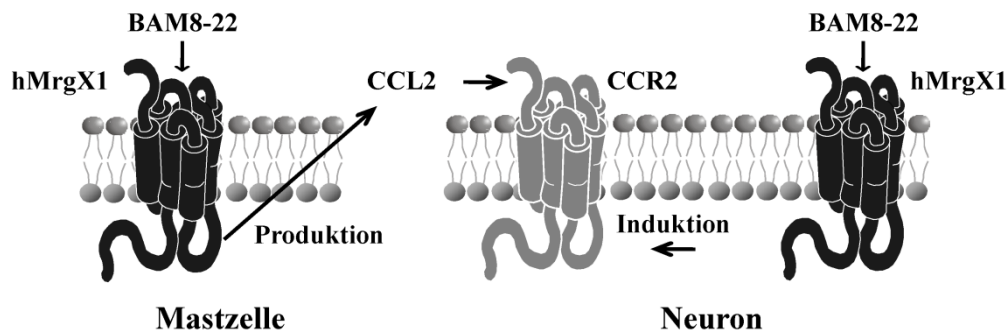


Abbildung 5.85: Zusammenfassende Darstellung der hMrgX1-vermittelten CCR2-Induktion in Spinalganglienneuronen und CCL2-Produktion in Mastzellen

Der hMrgX1-Rezeptor wird sowohl in Spinalganglienneuronen (rechts), als auch in Mastzellen (links) auf Proteinebene exprimiert. Die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors in Spinalganglienneuronen vermittelt über den Transkriptionsfaktor NFAT eine Induktion des CCR2, während in Mastzellen die Freisetzung von CCL2 durch den hMrgX1-Rezeptor induziert wird. Da Mastzellen vom Bindegewebstyp und Spinalganglienneurone häufig eng assoziiert vorkommen, ist angedeutet, dass die CCL2-Freisetzung aus solchen Mastzellen über den hMrgX1-vermittelt, induzierten CCR2 zu einer Stimulation von Spinalganglienneuronen führen könnte. Somit könnte die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors zur Etablierung einer chronisch-nozizeptiven CCL2/CCR2-Signalschleife zwischen Mastzellen und Spinalganglienneuronen führen.

6 Diskussion

6.1 Zusammenfassung hMrgX1-vermittelter Signalwege

Der Primaten-spezifische hMrgX1-Rezeptor stellt eine interessante molekulare Zielstruktur für eine neuartige, potentiell nebenwirkungsarme analgetische Therapie dar. Da im Genom von Nagetieren keine hMrgX1-homologen Gene existieren, wird debattiert, schmerzmodulierende Effekte der nah verwandten MrgC-Rezeptoren in Nagetieren als putative Funktionen des hMrgX1-Rezeptors im Menschen anzusehen. Mit dieser Annahme übereinstimmend konnten auch in Menschen pro-algetische Effekte des spezifischen hMrgX1-Agonisten BAM8-22 ermittelt werden (Sikand, 2011). Allerdings wurde bisher eine vergleichende pharmakodynamische Analyse von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren nicht durchgeführt, obwohl solche Daten notwendig wären, um die Validität der Übertragung von MrgC-Funktionen auf den hMrgX1-Rezeptor zu beurteilen.

Daher wurde in dieser Arbeit erstmals das Ligandenprofil von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren aus Maus und Ratte vergleichend analysiert. Auf Ebene der Rezeptor-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation ergaben sich in verschiedenen zellulären Expressionssystemen (HEK293- und F11-Zellen) Spezies-spezifische Unterschiede (vgl. Abschnitt 5.1). Während der mMrgC-Rezeptor durch die verschiedenen Peptide BAM8-22, γ_2 -MSH und Dynorphin-14 als volle Agonisten sowie NPFF und NPAF als partielle Agonisten aktiviert wurde, konnte für den rMrgC-Rezeptor lediglich eine aktivierende Wirkung von γ_2 -MSH sowie eine deutlich schwächere Aktivierung durch BAM8-22 festgestellt werden. Im signifikanten Unterschied dazu wurde der hMrgX1-Rezeptor exklusiv durch BAM8-22 aktiviert. Diese Unterschiede im Ligandenprofil wurden auf Ebene der Erk-1/2-Aktivierung bestätigt und deuten letztlich auf andersartig geformte Ligandenbindungstaschen zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren hin, was im Einklang mit der unabhängigen phylogenetischen Entstehung nicht-homologer Gene ist.

Neben diesem deutlichen Unterschied wurde zudem evident, dass hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren bei anhaltender Ligandenstimulation fundamental gegensätzlich reguliert werden. Während die MrgC-Rezeptoren über einen β -Arrestin-abhängigen Signalweg desensibilisieren und endozytiert werden, finden diese Regulationsprozesse am hMrgX1-Rezeptor nicht statt (vgl. Abschnitt 5.2). Somit konnte der hMrgX1-Rezeptor im Rahmen dieser Arbeit in die kleine Gruppe Endozytose-resistenter GPCR eingeordnet werden. Damit ist zumindest unsicher, ob experimentelle Daten bzgl. der

MrgC-Rezeptoraktivierung auf den hMrgX1-Rezeptor übertragen werden können, so dass im Rahmen dieser Arbeit auf zelluläre, von Spinalganglienneuronen abgeleitete Expressionssysteme (F11-Zellen und primäre Spinalganglienneurone) zurückgegriffen wurde, um so neue Zielstrukturen des hMrgX1-Rezeptors im Kontext der akuten und chronischen Schmerzwahrnehmung zu identifizieren.

Dabei wurde deutlich, dass durch den hMrgX1-Rezeptor die Aktivität des TRPV1-Ionenkanals, dessen Beteiligung an der akuten Nozizeption etabliert ist, auf duale Weise reguliert wird. Einerseits konnte die Sensitisierung des TRPV1 gegenüber CAP, Protonen und Temperatur auf eine PKC-vermittelte Phosphorylierung von Serin 502 und 800 zurückgeführt werden (vgl. Abschnitt 5.3.2). Andererseits ging vom hMrgX1-Rezeptor eine direkte Aktivierung des TRPV1 über einen distinkten Signalweg aus (vgl. Abschnitt 5.3.3). Durch verschiedene enzymatische Inhibitoren und gentechnisch modifizierte TRPV1-Expressionskonstrukte wurde dabei evident, dass der hMrgX1-Rezeptor über die PLC- β den zellulären DAG-Spiegel anhebt und damit einen endogenen TRPV1-Agonisten produziert. Außerdem wird gleichzeitig die Menge an PIP₂ reduziert, was in einer Disinhibition des TRPV1 resultiert.

Eine potentielle Bedeutung des hMrgX1-Rezeptors bei der peripheren Schmerzchronifizierung wurde über die transkriptionelle Induktion etablierter Markerproteine aufgeklärt. Zum einen wurde über die Aktivierung der Serin/Threonin-Kinasen Erk-1/2 eine ELK-1/Srf-abhängige transkriptionelle Regulation induziert (vgl. Abschnitt 5.4.1). Außerdem wurde Erk-1/2-abhängig c-Fos auf mRNA- und EGR-1 auf mRNA- und Proteinebene induziert. Interessanterweise ist sowohl für die Aktivierung der Erk-1/2 als auch für die Induktion von c-Fos und EGR-1 eine Bedeutung bei der Entstehung von chronisch-inflammatorischen Schmerzen beschrieben worden. Zum anderen führte die hMrgX1-vermittelte Ca²⁺-Mobilisation zur Aktivierung von NFAT über die Phosphatase Calcineurin, was schließlich in der Induktion des CCR2 resultierte (vgl. Abschnitt 5.4.2). Dieser GPCR ist entscheidend an der Entstehung von chronisch-neuropathischen Schmerzen beteiligt, bei deren Therapie bislang nur geringe Erfolge verzeichnet werden konnten.

Schließlich liefert diese Arbeit erstmals den Nachweis der endogenen Proteinexpression des hMrgX1-Rezeptors in LAD2-Mastzellen (vgl. Abschnitt 5.5). Da die Freisetzung des CCR2-Liganden CCL2 aus Mastzellen durch die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors induziert wurde, könnte die Blockade einer hMrgX1-induzierten potentiellen parakrinen CCL2/CCR2-Signalschleife von Mastzellen zu nozizeptiven Spinalganglienneuronen eine neue Möglichkeit der neuropathischen Schmerztherapie bieten.

Damit konnten im Rahmen dieser Arbeit neue Zielstrukturen des hMrgX1-Rezeptors nachgewiesen werden, die im Kontext der akuten Nozizeption oder der peripheren Schmerzchronifizierung bereits etabliert sind. Somit konnte ein Beitrag zum

besseren molekularen Verständnis der BAM8-22-induzierten Nozizeption geleistet werden (Abbildung 6.1).

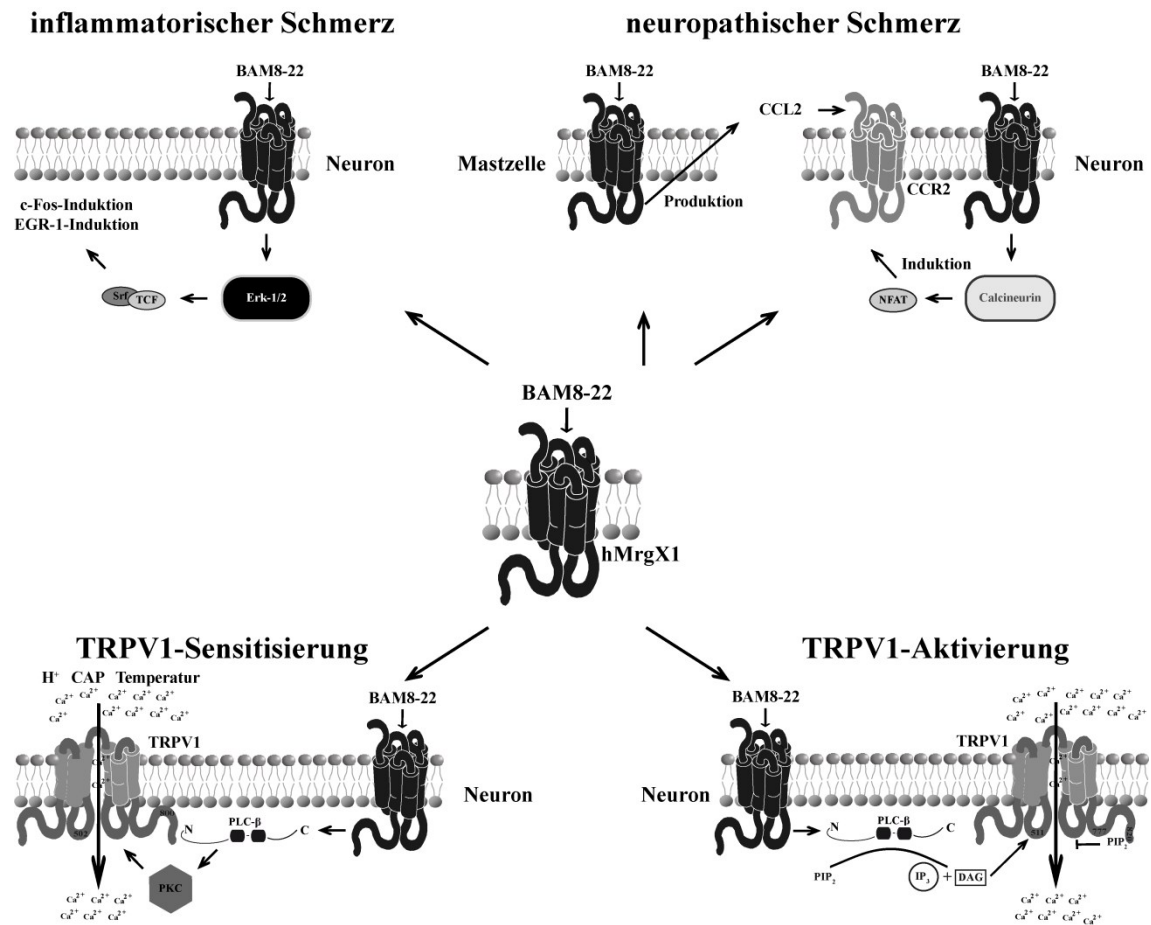


Abbildung 6.1: Zusammenfassende Darstellung hMrgX1-induzierter Signalwege

Ausgehend von einer BAM8-22-vermittelten Stimulation des hMrgX1-Rezeptors werden verschiedene Signalwege aktiviert, denen bereits eine Bedeutung bei der akuten Nozizeption oder bei der peripheren Schmerzchronifizierung zugeordnet werden konnte. Die PKC-vermittelte TRPV1-Sensibilisierung sowie die DAG-Produktion/PIP₂-Abbau-abhängige direkte TRPV1-Aktivierung sind dabei der akuten Nozizeption zuzurechnen. Die Erk-1/2/TCF/Srf-abhängige Induktion der IEG c-Fos und EGR-1 ist hingegen mit der Entwicklung chronisch-inflammatorischer Schmerzen assoziiert worden, während die Calcineurin/NFAT-abhängige Induktion des CCR2 mit der Entwicklung chronisch-neuropathischer Schmerzen in enger Verbindung steht. Da Mastzellen vom Bindegewebstyp häufig mit peripheren Nerven assoziiert sind, könnte letzterer Prozess zudem durch die hMrgX1-abhängige Freisetzung von CCL2 aus Mastzellen und die daraus resultierende parakrine Stimulation von CCR2-exprimierenden Spinalganglienneuronen verstärkt werden.

6.2 Pharmakologischer Vergleich von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren

Der phylogenetische Vergleich des Menschen, der Maus und der Ratte ergab, dass die Familie der Mrg-Rezeptoren des Menschen und der Nagetiere unterschiedlich aufgebaut ist (Dong, 2001, Lembo, 2002). Während die Subfamilien MrgD bis MrgH zwischen den Spezies konserviert vorliegen und dort Homologien identifiziert werden konnten, existieren im Genom der Nagetiere die Subfamilien MrgA, B und C, die im Menschen völlig fehlen. Stattdessen findet sich im Genom von Menschen und verschiedenen Primaten die MrgX-Subfamilie, die wiederum nicht in Nagetieren vorkommt (Burstein, 2006, Dong, 2001, Lembo, 2002, Zhang, 2005a). Trotz dieser genetischen Unterschiede konnten Übereinstimmung zwischen den MrgC-Rezeptoren aus Maus und Ratte und dem hMrgX1-Rezeptor identifiziert werden (Grazzini, 2004, Han, 2002, Lembo, 2002). Beispielsweise konnten überlappende Ligandenspektren beobachtet werden; allerdings ist die Aktivität aller mMrgC-Liganden weder am rMrgC-Rezeptor noch am hMrgX1-Rezeptor untersucht worden. Da die erhobenen pharmakologischen Daten zusätzlich in unterschiedlichen experimentellen und biologischen Systemen generiert wurden, sollte diese Arbeit die erste komplette vergleichende pharmakodynamische Analyse von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren liefern. Unabhängig vom detaillierten Erkenntnisgewinn über die Interaktion mit verschiedenen Liganden sind solche Daten zudem notwendig, um zu überprüfen, ob die vorgenommene Übertragung experimenteller Daten bzgl. der MrgC-Rezeptoraktivierung auf den hMrgX1-Rezeptor valide ist (Cai, 2007a, Chang, 2009, Chen, 2010, Chen, 2006, Chen, 2008, Chen, 2012, Grazzini, 2004, Hager, 2008, Hong, 2004, Jiang, 2006, Ndong, 2009, Zeng, 2004).

Im Rahmen dieser Arbeit konnten hMrgX1-, mMrgC- und rMrgC-Rezeptor stabil-exprimierende HEK293-Zellklone generiert werden, so dass die Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion vergleichend analysiert werden konnte. Für alle drei Rezeptoren war bereits die Ca^{2+} -Mobilisation aus intrazellulären Speichern etabliert (Grazzini, 2004, Han, 2002, Lembo, 2002), so dass dieser Signalweg auch hier als Nachweis der Rezeptoraktivierung gewählt wurde. Als Liganden wurden Spaltprodukte der Vorläuferproteine POMC, PENK, Prodynorphin und Pro-NPFF_A gewählt, für die bereits die Aktivierung von mMrgC-Rezeptoren (Han, 2002) gezeigt werden konnte (vgl. Tabelle 3.3). Nach Beladung der Zellen mit Fura2-AM (vgl. Abbildung 5.4) zeigte sich in Übereinstimmung mit der Literatur (Han, 2002), dass der mMrgC-Rezeptor ein breites Ligandenspektrum aufweist. So wirkten POMC- (γ_2 -MSH), PENK- (BAM8-22) und Prodynorphinspaltprodukte (Dynorphin-14) als volle Agonisten und Spaltprodukte des Pro-NPFF_A wiesen partiell agonistische Eigenschaften auf. Der rMrgC-Rezeptor wurde nur durch γ_2 -MSH und BAM8-22 aktiviert, wobei sich γ_2 -MSH durch eine

deutlich höhere intrinsische Effizienz und Potenz auszeichnete. Im deutlichen Unterschied zu den MrgC-Rezeptoren zeigte der hMrgX1-Rezeptor eine BAM8-22-selektive Ca^{2+} -Mobilisation und wurde durch kein anderes getestetes Peptid aktiviert.

Dieser Befund widerspricht einer Arbeit, in der eine γ_2 -MSH-induzierte hMrgX1-abhängige Ca^{2+} -Mobilisation (EC_{50} : 333 ± 130 nM) nachgewiesen wurde (Lembo, 2002). Allerdings muss darauf hingewiesen werden, dass in jener Arbeit ein EC_{50} -Wert von 14 ± 7 nM für die BAM8-22-induzierte hMrgX1-Aktivierung bestimmt wurde, in dieser Arbeit wurde hingegen mit 150 ± 10 nM ein etwa 10-fach höherer Wert ermittelt (vgl. Tabelle 5.1). Somit könnte eine geringere Sensitivität in dieser Arbeit zu einem falsch negativen Befund über die γ_2 -MSH-induzierte hMrgX1-abhängige Ca^{2+} -Mobilisation geführt haben. Daher wurde zusätzlich zur Fura2-AM-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisationsmessung eine Aequorin-abhängige Technik eingesetzt, die sich in dieser Arbeit durch eine 125-fach höhere Signalstärke auszeichnete. Unter diesen deutlich sensitiveren Bedingungen wurden allerdings im Wesentlichen alle pharmakologischen Daten aus den Fura2-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisationsmessungen bestätigt (vgl. Abbildung 5.6), insbesondere die BAM8-22-selektive Ca^{2+} -Mobilisation des hMrgX1-Rezeptors. Da die maximal getestete γ_2 -MSH Konzentration $2,5 \mu\text{M}$ betrug und damit etwa 10-fach oberhalb des ermittelten EC_{50} -Wertes aus der Arbeit von Lembo liegt (Lembo, 2002), kann eine geringere Sensitivität in dieser Arbeit nicht für die ermittelten Unterschiede bzgl. der γ_2 -MSH-induzierten hMrgX1-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisation verantwortlich sein. Außerdem stimmt die hier ermittelte Potenz der BAM8-22-induzierten hMrgX1-abhängigen Ca^{2+} -Mobilisation mit anderen Daten aus der Literatur überein (Burstein, 2006).

Eine Begründung für diese Diskrepanz könnte in dem, von Lembo verwendeten, zellulären Expressionssystem liegen. In dieser Arbeit wurde die hMrgX1-Funktion in $\text{G}\alpha_{q15}$ ko-exprimierenden HEK293-Zellen untersucht (Lembo, 2002). Da die Ko-Expression von G-Proteinen zu einer Erhöhung der Potenz eines Liganden führen kann (Florio, 1989, Haga, 1986), könnten die unterschiedlichen Daten in einem höheren G-Protein-Expressionsniveau in der Arbeit von Lembo begründet liegen. Möglicherweise ist der chimäre Charakter des ko-exprimierten G-Proteins auch von Bedeutung, da $\text{G}_{i/o}$ -koppelnde GPCR über ein $\text{G}\alpha_{q15}$ Protein unabhängig von $\text{G}_{\beta\gamma}$ -Komplexen und der Expression der, spezifisch durch $\text{G}_{\beta\gamma}$ -Komplexe aktivierten, PLC- β -Isoformen 2 und 3 zur Ca^{2+} -Mobilisation beitragen können (Coward, 1998). Da gerade für den hMrgX1-Rezeptor eine Aktivierung von $\text{G}_{q/11}$ - und von $\text{G}_{i/o}$ -abhängigen Signalwegen beschrieben wurde (Burstein, 2006, Chen, 2004, Gales, 2005), wäre somit denkbar, dass γ_2 -MSH spezifisch $\text{G}_{i/o}$ -koppelnde Konformationen des hMrgX1-Rezeptors bindet und damit stabilisiert. Lembo fand für die BAM8-22-vermittelte hMrgX1-abhängige Ca^{2+} -Mobilisation keine Effekte des $\text{G}_{i/o}$ -Inhibitors PTX (Lembo, 2002), so dass BAM8-22 im Unterschied zu γ_2 -MSH selektiv $\text{G}_{q/11}$ -koppelnde Konformationen des hMrgX1-

Rezeptors in $G\alpha_{q15}$ ko-exprimierenden HEK293-Zellen stabilisieren müsste. Nach Kenakin (Kenakin, 2011, Kenakin, 2010, Vaidehi, 2010) könnten demnach beide Peptide als *biased agonists* am hMrgX1-Rezeptor bezeichnet werden. In dieser Arbeit wurde kein Versuch unternommen, die G-Proteinkopplung des hMrgX1-Rezeptors in HEK293-Zellen zu analysieren, da bereits für verschiedene Rezeptoren gezeigt werden konnte, dass das Expressionsniveau verschiedener G-Proteine die Aktivierung von Signalwegen, die spezifischen G-Protein-Klassen zugeordnet werden, stark beeinflussen kann (Maeda, 1996, Yang, 1999). Damit sollte die detaillierte Analyse der G-Protein-Kopplung nur in primären, endogenen Expressionssystemen erfolgen, die allerdings für den hMrgX1-Rezeptor nicht zur Verfügung stehen.

Allerdings kann darauf hingewiesen werden, dass die BAM8-22-selektive Ca^{2+} -Mobilisation des hMrgX1-Rezeptors in F11-hMrgX1- und in hMrgX1-Rezeptor transient-exprimierenden F11-Zellen bestätigt werden konnte. Hingegen zeigten in F11-Zellen transient exprimierte MrgC-Rezeptoren nach Stimulation mit γ_2 -MSH aber durchaus eine deutliche Ca^{2+} -Mobilisation. Zusätzlich zu Verifizierung in einem Zellsystem, dessen Proteinausstattung jener eines endogenen Expressionssystems deutlich näher kommt, wurde die BAM8-22-selektive Signalweiterleitung des hMrgX1-Rezeptors neben der Ca^{2+} -Freisetzung auch auf Ebene der Erk-1/2-Aktivierung in HEK293-hMrgX1-Zellen bestätigt. Dabei zeigte sich ein ähnlicher EC_{50} -Wert (~ 110 nM) für BAM8-22 (vgl. Abbildung 5.56), so dass von einem proximal divergierenden oder linearen Signalweg ausgegangen werden kann. Schließlich war die vorherige Inkubation von γ_2 -MSH, Dynorphin-14 oder NPFF in F11-hMrgX1-Zellen nicht in der Lage, die BAM8-22-induzierten Ca^{2+} -Mobilisation zu blockieren, so dass die fehlende hoch-affine Bindung von γ_2 -MSH und den anderen mMrgC-aktivierenden Peptiden als Erklärung für die fehlende Aktivierung des hMrgX1-Rezeptors angesehen werden kann.

Somit konnte im Rahmen dieser Arbeit in verschiedenen Zellsystemen die BAM8-22-selektive Aktivierung distinkter Zielstrukturen durch den hMrgX1-Rezeptor etabliert werden, so dass deutliche Unterschiede im Ligandenprofil von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren bestehen. 2007 wurde eine putative 3D-Struktur des mMrgC-Rezeptors (Abbildung 6.2), die *in silico* mittels der MembStruk-Methode erstellt wurde, publiziert (Heo, 2007). So wurde die Ligandenbindungstasche zwischen den transmembranären Domänen 3, 4, 5 und 6 identifiziert, in der der Ligand senkrecht zur Membranoberfläche mit seinem C-terminalen Ende bindet. Dabei sind die Aminosäuren Aspartat 161 und 197 sowie Tyrosin 110 innerhalb des mMrgC-Proteins hauptsächlich an der Bindung eines Arginin-Phenylalanin-Dipeptides, bzw. der RF(Y)-Sequenz am C-terminalen Ende anderer Peptide, u. a. γ_2 -MSH und BAM8-22, beteiligt. Interessanterweise sind diese Aminosäuren auch im hMrgX1-Rezeptor konserviert (Abbildung 6.3, blaue Markierung).

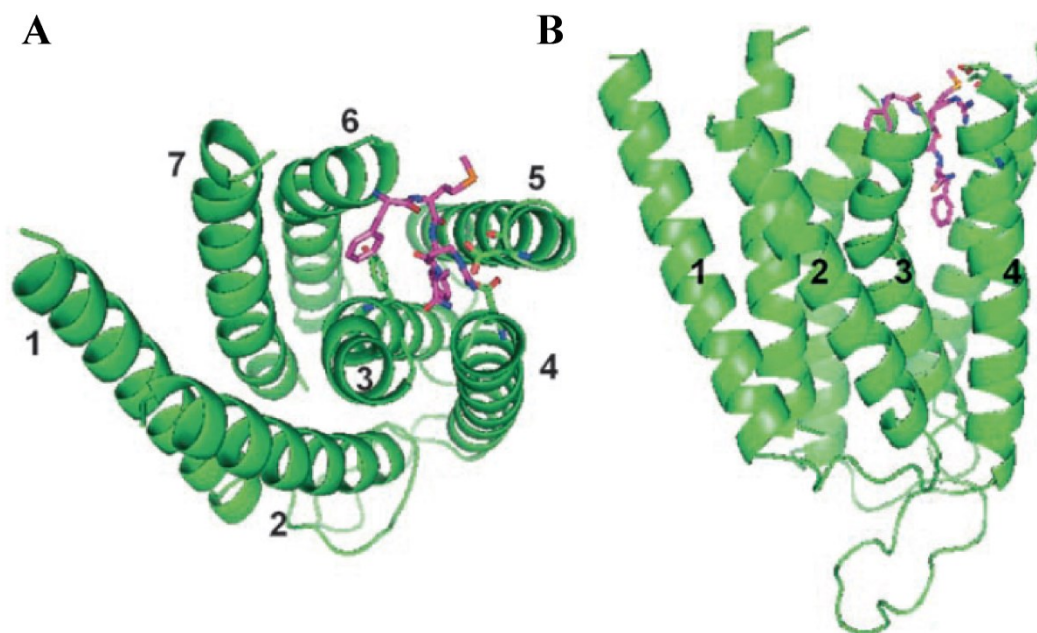


Abbildung 6.2: Putative 3D-Struktur des FMRF-Amid-gebundenen mMrgC-Rezeptors aus Heo, 2007

Die sieben transmembranären Domänen sind vom N-Terminus an durchnummeriert und die Aminosäuren Tyrosin 110, Aspartat 161 und Aspartat 197, welche entscheidend an der Bindung von FMRF-Amid und anderen Liganden, beispielsweise BAM8-22 oder γ_2 -MSH, beteiligt sind, sind besonders hervorgehoben. Der mMrgC-Rezeptor ist in einer Aufsicht von der extrazellulären Seite (A) oder in einer Seitenansicht (B) dargestellt.

Ein möglicherweise wichtiger struktureller Unterschied besteht aber im Fehlen von verschiedenen aromatischen Aminosäuren im hMrgX1-Protein (Abbildung 6.3, grüne Markierung), welche eine reißverschlußartige Interaktion zwischen den transmembranären Domänen 3, 6 und 7 im mMrgC-Protein (Abbildung 6.2) vermitteln könnten. Diese Interaktionsfläche verhindert den Zugang eines Agonisten von der beschriebenen Ligandenbindungstasche zu einer weiteren Kavität zwischen den transmembranären Domänen 1, 2, 3, 6 und 7. Möglicherweise deutet also die fehlende Interaktion der transmembranären Domänen 3, 6 und 7 eine andere Struktur der Ligandenbindungstasche im hMrgX1-Protein an, beispielsweise die Möglichkeit längere Peptide in horizontaler Bindungsrichtung aufzunehmen. Dieser Bindungsmodus wurde bereits für das Rhodopsin und seinen Liganden 11-cis-Retinal beschrieben (Okada, 2004). Weiterhin wurde postuliert, dass die Bindung von γ_2 -MSH im Vergleich mit der Bindung von BAM8-22 verändert abläuft (Heo, 2007). So hatte der Austausch von Tyrosin 110 zu Phenylalanin oder Tryptophan einen deutlichen inhibitorischen Effekt auf die BAM8-22-vermittelte mMrgC-Aktivierung, die Potenz von γ_2 -MSH blieb jedoch unverändert. Insofern könnte die Konservierung von Tyrosin 110 im hMrgX1-Protein (Abbildung 6.3) in guter Übereinstimmung mit der beobachteten selektiven Aktivierung des hMrgX1-Rezeptors durch BAM8-22 sein.

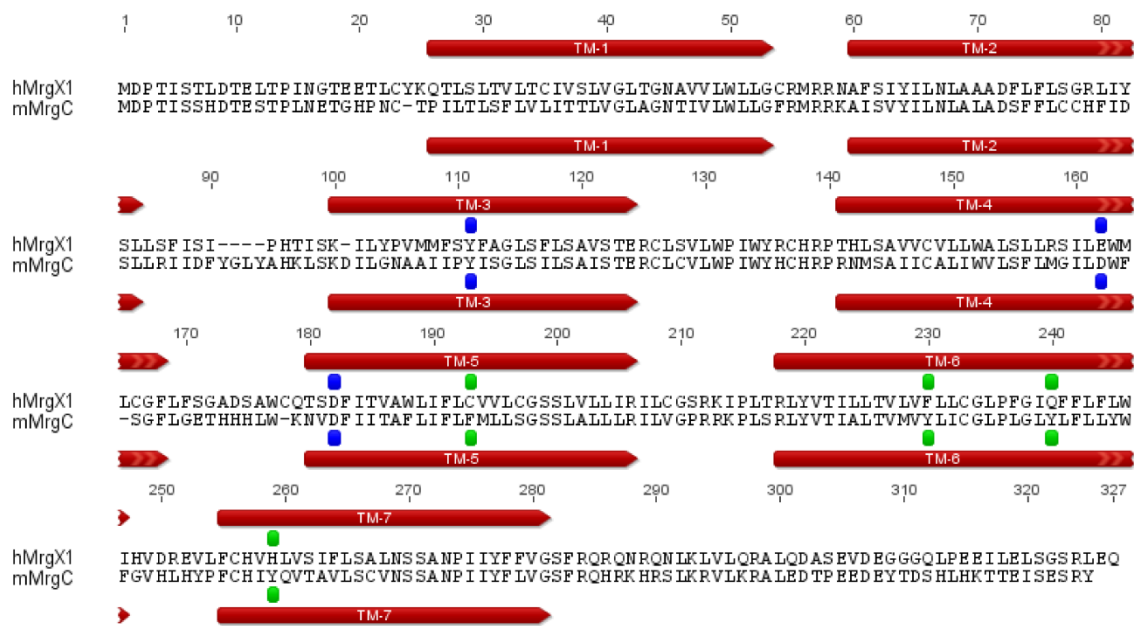


Abbildung 6.3: Abgleich der Proteinsequenz des hMrgX1- und mMrgC-Rezeptors

Die Proteinsequenzen des hMrgX1- und mMrgC-Rezeptors wurden mit dem Programm Geneious 6.0 (Biomatters Ltd., Auckland, Neuseeland) abgeglichen. Die putativen transmembranären Domänen (TM-1 bis TM-7) wurden nach Heo, 2007 durch rote Balken angegeben. Wichtige Aminosäuren für die Ligandenbindung des mMrgC-Rezeptors sind blau markiert (Tyrosin 110, Aspartat 161 und Aspartat 179). Diese Aminosäuren bzw. die Ladungsdichte der Aminosäuren sind im hMrgX1-Rezeptor konserviert. Außerdem sind aromatische Aminosäuren, welche eine reißverschlußartige Interaktion zwischen den transmembranären Domänen 3, 6 und 7 im mMrgC-Rezeptor vermitteln, in grün markiert. Diese Aminosäuren sind im hMrgX1-Rezeptor nicht konserviert.

Die genauen strukturellen Unterschiede zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren können endgültig erst durch kristallographische Studien geklärt werden. Die ermittelten, phänotypischen Unterschiede im Ligandenprofil zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren deuten jedoch darauf hin, dass verschiedene Konformationen von den Rezeptoren existieren und durch die Liganden unterschiedlich gut stabilisiert werden können. Da hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren keine homologen Gene repräsentieren, wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen angemahnt (Burstein, 2006, Chen, 2004), auf MrgC-Rezeptoren beruhende Daten nur mit Bedacht auf den hMrgX1-Rezeptor zu übertragen. Diese Schlußfolgerung bestätigend kann mit dem hier generierten Befund eines distinkten Ligandenprofils die Validität einer solchen Übertragung begründet angezweifelt werden.

6.3 Spezies-spezifische Endozytose innerhalb der BAM8-22-sensitiven Mrg-Rezeptoren

Bislang ist die Desensitisierung und Endozytose des hMrgX1-Rezeptors durch anhaltende Ligandenstimulation mit BAM8-22 nicht untersucht worden, so dass in dieser Arbeit die Desensitisierung und Endozytose von hMrgX1-Rezeptoren untersucht und mit jener von MrgC-Rezeptoren verglichen wurde. Als Anfangsbefund ergab sich eine Verminderung der BAM8-22-induzierten Ca^{2+} -Mobilisation in HEK293-mMrgC-Zellen nach vorheriger 30-minütiger Stimulation der Zellen mit BAM8-22 (vgl. Abbildung 5.13). Diese BAM8-22-induzierte Desensitisierung war spezifisch für den mMrgC-Rezeptor, da sie in HEK293-hMrgX1-Zellen nicht beobachtet werden konnte. Außerdem scheint es sich in HEK293-mMrgC-Zellen um eine homologe Desensitisierung zu handeln (vgl. Abschnitt 3.1.7.2), da Ca^{2+} -Signale eines anderen $\text{G}_{q/11}$ -koppelnden GPCR, des M3-Acetylcholinrezeptors, durch die BAM8-22 Vorstimulation nicht verändert wurden. Damit kann zum einen ausgeschlossen werden, dass der Befund durch eine Desensitisierung des gesamten zellulären Ca^{2+} -Mobilisationsweges erklärt werden kann. Zum anderen deutet die homologe Desensitisierung eine Beteiligung von GRK, β -Arrestinen und möglicherweise eine Rezeptorendozytose an.

Daher wurde nachfolgend die Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächenexpression von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren analysiert. Es konnte in Mrg-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellen ermittelt werden, dass der hMrgX1-Rezeptor gegenüber diesem Regulationsprozess resistent ist, während mMrgC- und rMrgC-Rezeptor durch die anhaltende Ligandenstimulation endozytiert werden (vgl. Abbildung 5.15 und 5.17). Mit diesem Befund kann die beobachtete Desensitisierung der mMrgC-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation gut erklärt werden. Aufgrund eines höheren Expressionsniveaus des hMrgX1-Rezeptors im Vergleich mit den MrgC-Rezeptoren könnte die fehlende Endozytose des hMrgX1-Rezeptors durch ein ungünstiges Verhältnis von Rezeptormolekülen an der Zelloberfläche zu akzessorischen Proteinen mit Beteiligung an der Endozytose begründet liegen (Breit, 2006b). Durch die transiente Expression der Rezeptoren in HEK293-Zellen wurden jedoch ähnliche Expressionsniveaus erreicht, die Spezies-spezifische Endozytose konnte allerdings weiterhin beobachtet werden (vgl. Abbildung 5.16). Zudem ist das selektive Fehlen von Spinalganglienneuronen-spezifischen Proteinen mit einer Funktion bei der GPCR-Endozytose als Begründung für die Resistenz des hMrgX1-Rezeptors gegenüber der Liganden-induzierten Endozytose äußerst unwahrscheinlich, weil nach transients und stabiler hMrgX1-Expression in F11-Zellen (vgl. Abbildung 5.18 und 5.19) und nach transients Expression in ND-C-Zellen (vgl. Abbildung 5.20) ebenso

keine Liganden-vermittelte hMrgX1-Endozytose ausgelöst wurde. Schließlich ist auch eine quantitativ niedrigere Signalstärke von hMrgX1- gegenüber MrgC-vermittelter Signalweiterleitung als Grund für die fehlende hMrgX1-Endozytose auszuschließen, da die Konzentration BAM8-22, welche zur Induktion der Endozytose eingesetzt worden ist, in hMrgX1-exprimierenden HEK293- und F11-Zellen jeweils stärkere Ca^{2+} -Signale induzierte, als in MrgC-Rezeptor-positiven Zellen. Somit kann das distinkte Verhalten nur durch Rezeptor-intrinsische Eigenschaften erklärt werden und damit wurde im Rahmen dieser Arbeit eine Spezies-spezifische Endozytose innerhalb der BAM8-22-sensitiven Mrg-Rezeptoren nachgewiesen.

So konnte der hMrgX1-Rezeptor in die sehr kleine Gruppe der nicht endozytierenden GPCR eingeordnet werden. Zu den Endozytose-resistenten GPCR gehören u. a. der β 3-Adrenozeptor, der Somatostatin-4-Rezeptor, der κ -Opioidrezeptor und der Prostaglandin-E2-Rezeptor (Chu, 1997, Csaba, 2001, Nantel, 1993, Penn, 2001). Interessanterweise konnte kürzlich gezeigt werden, dass der hMrgX2-Rezeptor ebenso in die Gruppe der nicht endozytierenden GPCR eingeordnet werden kann (Subramanian, 2011a). In hMrgX2-Rezeptor-positiven HEK293-Zellen konnte nach einer 5-minütigen Stimulation dieser Zellen mit hMrgX2-Liganden nur eine sehr schwache Rezeptorphosphorylierung festgestellt werden, während der C3a-Rezeptor, dessen Fähigkeit zur Liganden-induzierten Endozytose bereits etabliert war (Guo, 2011), sehr deutlich phosphoryliert wurde. Außerdem wurde evident, dass die Oberflächenexpression des hMrgX2-Rezeptors nach stabiler Expression in der Mastzelllinie HMC-1 durch anhaltende Ligandenstimulation für bis zu 30 Minuten nicht verändert wurde (Subramanian, 2011a). Somit könnte man vermuten, dass die gesamte hMrgX-Subfamilie, innerhalb derer 72 bis 98 % Übereinstimmung auf Ebene der Aminosäuresequenz bestehen (Dong, 2001, Lembo, 2002), zu den Endozytose-resistenten GPCR gehört. Solch eine Häufung Endozytose-resistenter GPCR innerhalb einer Subfamilie wäre jedoch außergewöhnlich, da die bislang bekannten, nicht endozytierenden GPCR innerhalb ihrer Subfamilie einzigartig sind. Beispielsweise werden der β 2-Adrenozeptor, die Somatostatin-1-, -2-, -3- und -5-Rezeptoren, der δ -Opioidrezeptor und der Prostaglandin-E4-Rezeptor Liganden-abhängig endozytiert (Chu, 1997, Csaba, 2001, Nantel, 1993, Penn, 2001).

Die MrgC-Rezeptoren aus Maus und Ratte konnten in dieser Arbeit in die große Gruppe der endozytierenden GPCR eingeordnet werden. Sie zeigten durch anhaltende Ligandenstimulation eine deutliche Verringerung ihrer Oberflächenexpression, welche bereits nach 5 Minuten fast vollständig ausgebildet war (vgl. Abbildung 5.14). Dies ist im Einklang mit einer Arbeit, in der für den mMrgC-Rezeptor, der an seinem C-Terminus mit YFP fusioniert worden ist, eine Zusammenlagerung fluoreszierender Proteine nach Stimulation mit γ 2-MSH beobachtet und mit einer erfolgten Endozytose gleichgesetzt worden ist (Han, 2002).

Die endozytierenden GPCR werden, abhängig vom zu Grunde liegenden Mechanismus, in drei Untergruppen eingeteilt (vgl. Abschnitt 3.1.7.3). Dabei wurde der mMrgC-Rezeptor in dieser Arbeit in die Untergruppe der β -Arrestin-abhängigen GPCR, die über Stachelsaumgrübchen, Klathrin und Dynamin endozytieren, eingeordnet. Dies konnte in der β -Arrestin-defizienten COS7-Zelllinie (Menard, 1997, Zhang, 1997) ermittelt werden, in der der mMrgC-Rezeptor durch BAM8-22 nicht mehr endozytiert werden konnte. Die Ko-Expression von β -Arrestin-1 oder -2 konnte jedoch den Phänotyp des mMrgC-Rezeptors aus β -Arrestin-exprimierenden HEK293-, F11- oder ND-C-Zellen wiederherstellen, indem unter diesen Bedingungen die mMrgC-Endozytose wieder induziert werden konnte.

Im Allgemeinen führt die Endozytose eines GPCR zu einer Verkürzung des induzierten Signals. Gerade deswegen konnte in dieser Arbeit auch die Desensibilisierung der mMrgC-vermittelten Ca^{2+} -Mobilisation ermittelt werden. Im Umkehrschluß bedeutet dies, dass nicht endozytierende GPCR in der Lage sein sollten, bei anhaltender Ligandenstimulation auch andauernd Signale weiterzuleiten. So konnte beispielsweise in einer *ex vivo* Präparation von Aortenringen der Ratte, die mit Adrenalin vorstimuliert wurden, gezeigt werden, dass die spezifische Aktivierung des β_3 -Adrenozeptors zu einer deutlich länger andauernden Vasodilatation führte, als wenn spezifisch der endozytierende β_2 -Adrenozeptor aktiviert wurde (Trochu, 1999). Möglicherweise wurde in der vorliegenden Arbeit ein erster Hinweis auf eine prolongierte Signalweiterleitung durch den hMrgX1-Rezeptor auf zellulärer Ebene generiert, da dies eine mögliche Erklärung für die Induktion des CCR2 darstellen könnte, welche durch den endozytierenden B2R (Lamb, 2001) nicht vermittelt wurde (vgl. Abschnitt 6.5). Ausgehend von den akuten pro-algetischen Befunden nach einer BAM8-22-Applikation im Menschen (Sikand, 2011) könnte postuliert werden, dass der hMrgX1-Rezeptor auch *in vivo* über längere Zeit Signale weiterleiten kann, damit langanhaltend pro-algetisch wirkt und somit an der Schmerzchronifizierung beteiligt ist. Interessanterweise konnte in dieser Arbeit auch festgestellt werden, dass verschiedene Markerproteine der Schmerzchronifizierung durch hMrgX1-vermittelte Signaltransduktion induziert werden (vgl. Abschnitt 6.5), so dass die Analyse der Beteiligung des hMrgX1-Rezeptors an der Schmerzchronifizierung in geeigneten Modellsystemen sinnvoll erscheint.

Vor wenigen Jahren kam das Konzept der G-Protein-unabhängigen Signalweiterleitung durch GPCR auf, in dem GRK und β -Arrestine als bedeutende Signaltransduktionsmoleküle identifiziert werden konnten (Azzi, 2003, Luttrell, 2001, Seta, 2002, Wei, 2003, Luttrell, 1999). In Verbindung mit dieser Theorie könnte man davon ausgehen, dass MrgC-Rezeptoren zusätzliche Zielstrukturen zur Verfügung stehen, um Signalwege anzustoßen. Da im Rahmen dieser Arbeit der Fokus jedoch auf den hMrgX1-Rezeptor gelegt wurde, müssen weitere Arbeiten klären, ob MrgC-Rezeptoren spezifische Signalwege über β -Arrestine anstoßen können.

Im Kontext der Wirkstoffentwicklung sind Kenntnisse über das Desensitisierungs- und Endozytoseverhalten eines GPCR von entscheidender Bedeutung. So wurde für die Opioidrezeptoren das RAVE-System etabliert (Whistler, 1999), indem die Neigung eines Opioids, Rezeptor-vermittelte Signaltransduktion auszulösen, mit der Induktion der Endozytose des Rezeptors korreliert wird. Dabei wurde Morphin als Opioid, das potent Signaltransduktion über den μ -Opioidrezeptor induzieren kann, hingegen aber keine Endozytose induziert, identifiziert, während gegenteilig dazu durch Methadon Signaltransduktion und Endozytose des μ -Opioidrezeptors vermittelt werden. Whistler und Kollegen schlagen den Quotienten aus relativer Signaltransduktion und relativer Endozytose als prädiktives Maß für die Toleranzentwicklung eines Opioids vor (Whistler, 1999). Demnach wird die Toleranzentwicklung durch Morphin (RAVE: 3,88) jene durch Methadon (RAVE: 0,86) deutlich übersteigen. Als mechanistische Begründungen für diesen Vorschlag kann zum einen die zunehmende Entkopplung des aktivierten μ -Opioidrezeptors von seinen Zielstrukturen bei anhaltender Ligandenstimulation angeführt werden (Williams, 2001). Zum anderen laufen parallel zur andauernden Signaltransduktion über den aktivierten Rezeptor zelluläre Adaptationsprozesse ab, die der Rezeptoraktivierung funktionell entgegen wirken. Ein Beispiel eines solchen Prozesses stellt eine erhöhte Aktivität der AC, welche als cAMP-Superaktivierung bezeichnet wird, dar (Avidor-Reiss, 1996, Chieng, 1998). Letztere Begründung wird übrigens als zelluläres Korrelat von Entzugserscheinungen aufgefasst (Alvarez, 2001). Die Resensitisierung des Rezeptors und die Verhinderung funktionell-antagonistischer Adaptationsprozesse sollte durch die Induktion der Liganden-induzierten Endozytose des μ -Opioidrezeptors bewerkstelligt werden. Diese Hypothese wurde *in vitro* (Finn, 2001) und *in vivo* (Kim, 2008) unter Einsatz chimärer Opioidrezeptoren, bei denen der C-Terminus durch jenen des δ -Opioidrezeptors ausgetauscht worden ist, bestätigt. So konnte gezeigt werden, dass solche Rezeptoren im Gegensatz zu WT- μ -Opioidrezeptoren durch Morphin endozytiert werden. Ebenso wurde ermittelt, dass nach chronischer Morphingabe auf zellulärer Ebene keine cAMP-Superaktivierung und auf Ebene des gesamten Organismus keine Toleranzentwicklung stattfand. Damit liefert das RAVE-System ein sehr gutes Beispiel für die Verbindung pharmakodynamischer Prozesse auf der Ebene einzelner Zellen mit ernsthaften Problemen bei der Therapie von Patienten und macht deutlich, wie wichtig das Verständnis dieser Regulationsprozesse für eine rationale Wirkstoffentwicklung ist. So sollte im Falle der Opioidrezeptoren nach Liganden gesucht werden, die sich durch eine gute Aktivierung der Signaltransduktion und ebenso durch eine gute Induktion der Rezeptorendozytose auszeichnen. Von solchen Liganden ist ein geringes Potential an Toleranzentwicklung im Zuge der analgetischen Therapie zu erwarten.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten deutliche Unterschiede der Pharmakologie und der Liganden-abhängigen Regulation zwischen hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren

identifiziert werden. Damit kann nicht sicher davon ausgegangen werden, dass hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren trotz einiger Gemeinsamkeiten prinzipiell ähnliche Funktionen haben und durch die Analyse eines BAM8-22-sensitiven Rezeptors allgemeingültige Daten für alle BAM8-22-sensitiven Rezeptoren generiert werden können. Konsequenterweise sind Mäuse oder Ratten demnach auch nicht als Modellsystem für hMrgX1-vermittelte Signaltransduktion oder als Testsystem für Wirkstoffe, die am hMrgX1-Rezeptor angreifen sollen, geeignet. Damit sollte überlegt werden, ob Primaten ein geeignetes System für solche Untersuchungen darstellen. Da bereits homologe MrgX1-Proteine in Makaken und Rhesusaffen identifiziert wurden (Burstein, 2006, Zhang, 2005a), bieten diese Spezies zumindest von einer genomischen Sichtweise ein geeignetes Rezeptorrepertoire. Allerdings können durchaus ethische Einwände gegen grundlegende Funktionsstudien eines pro-algetisch wirkenden Rezeptors in Affen angeführt werden. Eine Möglichkeit, dieses Problem zu umgehen, stellen sog. humanisierte Tiermodelle dar. In solchen Tiermodellen werden humane Gene in das tierische Genom eingeschleust, um so deren Funktion zu analysieren. Für die Analyse des hMrgX1-Rezeptors wäre es zudem notwendig, bestehende BAM8-22-sensitive Rezeptoren im tierischen Genom auszuschalten, um den hMrgX1-Rezeptor spezifisch aktivieren zu können. Im Genom der Maus haben multiple Insertionsereignisse des Retrotransposons L1 zu einer atypischen Vermehrung von Mrg-Genen geführt (Zylka, 2003), so dass eine Anhäufung von insgesamt 53 Genen, davon 21 Pseudogene, auf dem murinen Chromosom 7 im Laufe der phylogenetischen Entwicklung der Mausspezies stattgefunden hat. Diese genomische Organisation und die Tatsache, dass die Liganden vieler muriner Mrg-Rezeptoren noch nicht bekannt sind und daher eine gewissen pharmakologische Redundanz befürchtet wurde, führte dazu, dass Gen-defiziente Mäuse mit nur einem fehlenden Mrg-Gen bislang nicht generiert wurden. Stattdessen wurde eine sog. *cluster-knockout*-Mauslinie publiziert, der insgesamt zwölf Mrg-Gene fehlen (Liu, 2009). Diese Strategie macht es jedoch äußerst schwierig, phänotypische Veränderungen gegenüber WT-Tieren der Funktion eines einzelnen Rezeptors zuzuordnen. Daher erscheint es äußerst schwierig, eine humanisierte Maus zur Analyse des hMrgX1-Rezeptors herzustellen. Im Genom der Ratte ist die Anzahl an Mrg-Rezeptoren mit 13 exprimierten Rezeptoren jedoch deutlich kleiner (Zylka, 2003), so dass ein geringeres Maß an Redundanz befürchtet werden muss. Allerdings konnten bislang Methoden, mit deren Hilfe Gen-defiziente Mäuse generiert wurden, nicht erfolgreich auf die Herstellung Gen-defizienter Ratten übertragen werden (Mashimo, 2010). Zinkfinger-Nukleasen werden jedoch seit kurzem erfolgreich eingesetzt, um Gen-defiziente Ratten zu generieren (Chu, 2012, Handel, 2011, Mashimo, 2010, Moreno, 2011, Zschemisch, 2012) und stellen damit ein hoffnungsvolles molekularbiologisches Werkzeug dar, um zukünftig ein humanisiertes Rattenmodell zur Analyse des hMrgX1-Rezeptors zu etablieren.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde sich, als Konsequenz der beschriebenen pharmakodynamischen Unterschiede von hMrgX1- und MrgC-Rezeptoren, der Analyse von hMrgX1-induzierten Signalwegen in F11-hMrgX1-Zellen zugewandt, welche aufgrund ihrer stabilen Rezeptorexpression gleichbleibende experimentelle Bedingungen garantieren. Außerdem sind F11-Zellen von Spinalganglienneuronen abgeleitet worden (Platika, 1985a, Platika, 1985b), so dass deren Proteinausstattung einem MrgX1-Rezeptor-exprimierenden primären Spinalganglienneuron äußerst nahe kommt. Dies konnte bereits in einer Vielzahl von Arbeiten bestätigt werden, in denen Signaltransduktionswege in F11-Zellen und primären Spinalganglienneuronen übereinstimmen (Eijkelkamp, 2010, Fan, 1993, Fan, 1992, Fioravanti, 2008, Francel, 1987a, Francel, 1987b, Gaudioso, 2012, Jow, 2006, Jung, 2008a, Jung, 2008b, Li, 2004, McIlvain, 2006, Puttfarcken, 1997, Boland, 1991, Rothe, 2012). Da Zelllinien, die den hMrgX1-Rezeptor endogen exprimieren, und primäre humane Spinalganglienneurone nicht zur Verfügung stehen, stellen F11-hMrgX1-Zellen also das bestmögliche zelluläre System zur Analyse von Funktionen des hMrgX1-Rezeptors dar.

Außer spannungsgesteuerten Ca^{2+} - und M-Typ K^{+} -Kanälen (Chen, 2004) waren bislang keine Zielstrukturen des hMrgX1-Rezeptors bekannt, so dass im Rahmen dieser Arbeit exemplarisch untersucht wurde, ob der akut pro-algetisch wirkende TRPV1-Ionenkanal durch den hMrgX1-Rezeptor reguliert wird (Abschnitt 6.4) und ob der hMrgX1-Rezeptor über transkriptionelle Regulationsprozesse an der Induktion chronischer Schmerzmarker beteiligt ist (Abschnitt 6.5).

6.4 Duale Regulation des akut pro-algetisch wirkenden TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor

Die Injektion des spezifischen TRPV1-Agonisten CAP (Caterina, 1997) in die Hinterpfote von Mäusen löst sofortige Schmerzreaktionen, u. a. Anheben und Lecken der injizierten Pfote, aus (Sakurada, 1992). Im Unterschied zur Injektion von Formalin halten die Schmerzreaktionen für nur wenige Minuten an und zeichnen sich nicht durch ein zweite sub-akute Phase aus (Hunskar, 1985). Daher kann als akzeptiert gelten, dass durch die Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals akut pro-algetische Signalwege angestoßen werden, die letztlich in einer Schmerzempfindung des gesamten Organismus resultieren. Entsprechend beschrieben auch humane Probanden die Injektion von CAP in die Haut als schmerzhaft (Simone, 1989). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit der TRPV1-Ionenkanal als prototypische akut pro-algetische Zielstruktur ausgewählt.

Die Funktion des TRPV1 wird nicht nur durch verschiedene Liganden, z. B. CAP, Protonen oder erhöhte Temperatur reguliert, sondern der TRPV1 ist auch als wichtige Zielstruktur identifiziert worden, dessen Aktivität durch verschiedene GPCR reguliert wird (Jara-Oseguera, 2008). Daher wurde im Rahmen dieser Arbeit die funktionelle Interaktion von hMrgX1-Rezeptoren und TRPV1 analysiert. Beide Proteine werden in nozizeptiven Spinalganglienneuronen exprimiert (Jara-Oseguera, 2008, Lembo, 2002), so dass die Analyse der funktionellen Interaktion von hMrgX1-Rezeptoren und TRPV1 sinnvoll ist. Allerdings sind bislang auf zellulärer Ebene noch keine Ko-Lokalisationsstudien von hMrgX1-Rezeptor und TRPV1 durchgeführt worden. Interessanterweise konnte jedoch für den nah verwandte MrgX2-Rezeptor in Makaken eine Ko-Expression mit dem TRPV1 in Spinalganglienneuronen etabliert werden (Zhang, 2005a).

Nachdem in HEK293-Zellen erste Hinweise auf eine funktionelle Interaktion von TRPV1 und hMrgX1-Rezeptor gesammelt werden konnten (vgl. Abschnitt 5.3.1), wurde die weitere funktionelle Analyse der hMrgX1-TRPV1-Interaktion in F11-hMrgX1-Zellen, in denen der TRPV1 transient ko-exprimiert wurde, durchgeführt. In Bezug auf die funktionelle Modulation des TRPV1 konnte im Rahmen dieser Arbeit in F11-hMrgX1-Zellen die Sensibilisierung des TRPV1 durch Bradykinin über den endogen exprimierten B2R (Platika, 1985b) bestätigt werden. Da bereits bekannt war, dass eine Behandlung von Zellen mit Bradykinin zu einer vermehrten Responsibilität des TRPV1 gegenüber seinen Agonisten führt (Cesare, 1999, Chuang, 2001, Vellani, 2001), konnten somit im gewählten Zellmodell Daten aus primären Spinalganglienneuronen reproduziert werden. Damit kann konstatiert werden, dass F11-Zellen auch für die Analyse der TRPV1-Funktion ein geeignetes Modellsystem darstellen.

6.4.1 Sensitisierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor

Im Rahmen dieser Arbeit führte die vorherige Inkubation von F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen mit BAM8-22 ebenso wie mit Bradykinin zu einer Sensitisierung des TRPV1. Demnach führte die Aktivierung des TRPV1 nach vorheriger Stimulation des hMrgX1-Rezeptors zu einem deutlich stärkeren Mn^{2+} -Einstrom im Vergleich mit nicht vorstimulierten Zellen (vgl. Abbildung 5.26). Dabei wurde der TRPV1 gleichermaßen für CAP, Protonen und Temperatur sensitiert, so dass von einer Sensitisierung aller Aktivierungsmodi ausgegangen werden kann. Da die TRPV1-Sensitisierung für alle drei Stimuli vollständig durch die vorherige Inkubation mit dem PKC-Inhibitor BIM-X (Bit, 1993, Wilkinson, 1993) blockiert werden konnte, kann in Bezug auf die TRPV1-Sensitisierung von einem einheitlichen Signalweg ausgegangen werden. Die Beteiligung der PKC an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Sensitisierung konnte zusätzlich durch zwei TRPV1-Mutanten, denen die etablierten PKC-Phosphorylierungsstellen Serin 502 oder Serin 800 fehlten (Vellani, 2001, Numazaki, 2002), nachgewiesen werden, da beide Mutanten durch den hMrgX1-Rezeptor nicht mehr sensitiert wurden (vgl. Abbildung 5.27).

Eine Sensitisierung des TRPV1 ist für eine Reihe weiterer $G_{q/11}$ -koppelnder Rezeptoren beschrieben worden, beispielsweise für die Nukleotidrezeptoren P2Y-1 und -2, den Serotonin-2-Rezeptor, den Endothelin-1-Rezeptor, die Prostanoidrezeptoren EP-1 und IP oder die Protease-aktivierten Rezeptoren PAR-1, -2 und -4 (Dai, 2004, Moriyama, 2003, Ohta, 2006, Plant, 2007, Tominaga, 2001, Vellani, 2010, Moriyama, 2005). Dabei wurde die TRPV1-Sensitisierung durch die jeweiligen Agonisten dieser GPCR als wichtige molekulare Determinante der ebenfalls ausgelösten inflammatorischen Schmerzen identifiziert (Vay, 2012). So zeichnet sich die Entzündung eines Gewebes durch eine erhöhte Durchblutung und damit Temperatur aus (Vay, 2012). Außerdem sinkt der pH-Wert im entzündeten Gewebe, da Zellen des Immunsystems saure Granula ausschütten und im Zuge der Zellnekrose sowie einer lokalen metabolischen Änderung ebenfalls Protonen ins Interstitium freigesetzt werden (Voilley, 2004). Beides führt, in Kombination mit einer GPCR-induzierten PKC-vermittelten TRPV1-Phosphorylierung, zu einer erhöhten TRPV1-Aktivität, die schließlich in einer Depolarisation von Nozizeptoren und damit in Schmerzempfindungen resultiert (Vay, 2012). Insofern ist die hier ermittelte hMrgX1-induzierte Sensitisierung des TRPV1 über den etablierten PKC-Signaltransduktionsweg geeignet, um für den hMrgX1-Rezeptor ebenso eine Rolle bei der Auslösung inflammatorischer Schmerzen zu postulieren. In diesem Sinne ist die Beobachtung der mechanischen Hyperalgesie nach der Applikation von BAM8-22 im Menschen (Sikand, 2011) möglicherweise als Folge einer TRPV1-Sensitisierung zu interpretieren, da

dessen Aktivierung in der Ausbildung von thermischer und mechanischer Hyperalgesie resultieren kann (Kitagawa, 2012, Ro, 2009).

6.4.2 Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor

Im Vergleich zur Sensibilisierung des TRPV1 gegenüber seinen Agonisten, ist sehr wenig über die GPCR-vermittelte direkte Aktivierung des TRPV1 bei neutralem pH-Wert, Raumtemperatur und ohne Zugabe von CAP bekannt. Lediglich für den B2R, den H1R, den M1R und den mGluR5 wird eine direkte TRPV1-Aktivierung diskutiert (Kim, 2009b, Woo, 2008, Chuang, 2001, Shim, 2007, Shin, 2002). Nichtsdestotrotz wird der TRPV1, ganz im Gegensatz zu Mitgliedern der klassischen TRPC-Familie (Gudermann, 2004), nicht als Rezeptor-operierter Kanal im engeren Sinne angesehen.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die TRPV1-Aktivität durch Applikation des hMrgX1-Agonisten BAM8-22 bei einem pH-Wert von 7,4 und einer Temperatur von 20 bis 25 °C ohne Zugabe von CAP deutlich gesteigert (vgl. Abschnitt 5.3.3). So war nur in TRPV1-positiven F11-hMrgX1-Zellen nach Stimulation mit dem hMrgX1-Agonisten BAM8-22 ein deutlich größeres Ca^{2+} -Signal, ein deutlich größerer Mn^{2+} -Einstrom aus dem extrazellulären Raum und eine erhöhte transmembranäre Leitfähigkeit mit TRPV1-typischer Strom-Spannungsbeziehung zu beobachten. Außerdem konnte die Erhöhung der jeweiligen Signale jeweils durch den TRPV1-spezifischen Antagonisten BCTC (Valenzano, 2003) komplett blockiert werden, so dass auf Grund der hier generierten Daten von einer direkten Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor ausgegangen werden kann. Die beschriebene direkte TRPV1-Aktivierung ist möglicherweise als molekulare Grundlage für die beobachtete akute Schmerzwahrnehmung nach Applikation von BAM8-22 im Menschen (das maximale Schmerzempfinden wurde innerhalb der ersten Minute nach Applikation von BAM8-22 erreicht) aufzufassen (Sikand, 2011).

Weiterhin wurde der genaue Signaltransduktionsweg der hMrgX1-induzierten direkten TRPV1-Aktivierung analysiert. Da die hMrgX1-vermittelte Sensibilisierung des TRPV1 vollständig von der Aktivität der PKC abhing, wurde durch die vorherige Inkubation mit BIM-X analysiert, ob die direkte TRPV1-Aktivierung ebenso PKC-abhängig vermittelt wird. Es konnte allerdings kein inhibierender Effekt von BIM-X auf BAM8-22-induzierte Ca^{2+} -Signale, Mn^{2+} -Einströme aus dem extrazellulären Raum oder TRPV1-typische Ströme ermittelt werden. Da zusätzlich die PKC-defizienten TRPV1-Mutanten TRPV1-S502A und -S800A durch den hMrgX1-Rezeptor weiterhin aktiviert wurden (vgl. Abbildung 5.31), kann somit eine Beteiligung der PKC an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung in F11-hMrgX1-Zellen ausgeschlossen werden. Dies ist insbesondere bemerkenswert, da der PKC-Aktivator PMA zu einer direkten TRPV1-

Aktivierung führte (vgl. Abbildung 5.40) und somit prinzipiell eine direkte PKC-vermittelte TRPV1-Aktivierung in F11-hMrgX1-Zellen stattfinden kann.

Für B2R und H1R wurde eine Beteiligung der Produktion des endogenen Vanilloids 12-HPETE durch die Lipoxygenase an der direkten TRPV1-Aktivierung postuliert (Shim, 2007, Shin, 2002). Im Rahmen dieser Arbeit konnte allerdings unter Nutzung des Lipoxygenase-Inhibitors NDGA ermittelt werden, dass die TRPV1-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor unabhängig von Lipoxygenase-Produkten vermittelt wird (vgl. Abbildung 5.35). Da die Bradykinin-vermittelte TRPV1-Aktivierung jedoch partiell durch NDGA blockiert wurde, konnten zum einen Daten aus der Literatur bestätigt und zum anderen die Aktivität des Inhibitors unter den eingesetzten Bedingungen nachgewiesen werden.

Die Bedeutung der PLC- β bei der GPCR-vermittelten TRPV1-Aktivierung wird diskutiert, da sowohl die Abnahme des PLC- β -Substrates PIP₂ (Chuang, 2001) als auch die PLC- β -abhängige Produktion von DAG (Kim, 2009b, Woo, 2008) an der GPCR-vermittelten TRPV1-Aktivierung beteiligt sein soll. Allerdings wurden die inhibitorischen Einflüsse von PIP₂ und die aktivierende Wirkung von DAG in anderen Arbeiten angezweifelt (Hofmann, 1999, Stein, 2006, Zhang, 2005b). Im Rahmen dieser Arbeit konnte jedoch gezeigt werden, dass die Blockade der PLC- β -Aktivität zur Inhibition der hMrgX1-vermittelten Ca²⁺-Mobilisation aus dem ER und gleichzeitig zur Inhibition der direkten TRPV1-Aktivierung führte (vgl. Abbildung 5.37). Nach der Entleerung intrazellulärer Speicher mit Tapsigargin wurde der TRPV1 weiterhin durch den hMrgX1-Rezeptor aktiviert, obwohl die Ca²⁺-Mobilisation in TRPV1-negativen F11-hMrgX1-Zellen komplett fehlte. Damit konnte eine Beteiligung der IP₃-induzierten Ca²⁺-Mobilisation an der TRPV1-Aktivierung ausgeschlossen werden, so dass sich zunächst dem anderen PLC- β -Produkt, DAG, zugewandt wurde, welches kürzlich als aktivierender Ligand des TRPV1-Proteins vorgeschlagen worden ist (Woo, 2008). Allerdings existieren gegensätzliche Befunde, so wurde beispielsweise die Aktivierung der klassischen TRPC-Familie nicht aber des TRPV1 durch DAG bzw. dessen membranpermeables Analogon OAG beschrieben (Hofmann, 1999). Diese konträren Befunde deuten möglicherweise auf eine starke Abhängigkeit vom genutzten zellulären System hin, da einerseits *chinese hamster ovary*-Zellen zur Expression des TRPV1 genutzt wurden (Hofmann, 1999), während andererseits die DAG/OAG-vermittelte TRPV1-Aktivierung in HEK293-Zellen und primären Spinalganglienneuronen untersucht wurde (Woo, 2008). In dieser Arbeit konnte in F11-hMrgX1-Zellen eine TRPV1-Aktivierung durch exogene Gabe von OAG sowie durch die Akkumulation von endogen-produziertem DAG nachgewiesen werden. Da die Aktivierung des TRPV1 unter Blockade der PKC mittels BIM-X weiterhin beobachtet und die DAG-bindungsdefiziente Mutante TRPV1-Y511A (Woo, 2008) durch OAG nicht mehr aktiviert wurde, kann DAG als endogener TRPV1-Ligand angesehen werden, dessen

direkte Bindung an den TRPV1 auch in F11-hMrgX1-Zellen über Tyrosin 511 abläuft (vgl. Abschnitt 5.3.3.6). Unter Nutzung dieser TRPV1-Mutante konnte sodann gezeigt werden, dass die DAG-Produktion entscheidend an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung beteiligt ist (vgl. Abbildung 5.44). Allerdings wurde nur eine partielle Inhibition der Rezeptor-vermittelten TRPV1-Aktivierung ermittelt (~70 %), so dass von einem zusätzlichen Signaltransduktionsmechanismus distal der PLC- β auszugehen war, da die TRPV1-Y511A-Mutante im Gegensatz zur Inhibition der PLC- β die hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung nicht vollständig blockieren konnte.

Die TRPV1-Aktivierung durch eine Entfernung der tonischen Inhibition durch PIP₂ wurde bereits postuliert (Chuang, 2001, Prescott, 2003). Zum einen ist eine TRPV1-Aktivierung in *inside-out*-Membranstücken TRPV1-exprimierender Oozyten nach PIP₂-Ablation durch einen monoklonalen Antikörper beschrieben worden (Chuang, 2001) und zum anderen konnte eine PIP₂-Bindungsstelle im C-terminalen Bereich des TRPV1-Proteins identifiziert werden, die für eine basale Inhibition der TRPV1-Aktivität sorgt (Prescott, 2003). Durch andere Arbeiten wurde die PIP₂-vermittelte Inhibition basaler TRPV1-Aktivität aber in Frage gestellt (Stein, 2006, Zhang, 2005b). So wurde beispielsweise eine PIP₂-vermittelte Sensibilisierung des TRPV1 gegenüber CAP in *inside-out*-Membranstücken TRPV1-exprimierender F11-Zellen sowie eine Inhibition des CAP-vermittelten TRPV1-Stroms durch Sequestrierung von PIP₂ mittels Poly-L-Lysin ermittelt (Stein, 2006). Die Lösung dieses Widerspruchs erfolgte möglicherweise durch Lukacs und Kollegen, die ebenso eine Aktivierung des TRPV1 durch PIP₂ in *inside-out*-Membranstücken TRPV1-exprimierender HEK293-Zellen detektieren konnten (Lukacs, 2007). Dieser Effekt zeigte sich jedoch nicht in ganzen Zellen, stattdessen wurde ermittelt, dass PIP₂ in ganzen Zellen einen dualen Effekt auf die TRPV1-Aktivität ausübt. Während hohe PIP₂-Konzentrationen einen inhibitorischen Effekt auf den TRPV1 haben und demnach eine GPCR-vermittelte PLC- β -Aktivierung den Kanal disinhibieren kann, führt eine starke Depletion von PIP₂ aus der Membran zur Desensibilisierung des TRPV1, so dass PIP₂ unter diesen Umständen aktivierend wirkt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zur Analyse des Effektes von PIP₂ auf die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung die beschriebene PIP₂-bindungsdefiziente TRPV1-Mutante TRPV1- δ 777-820 generiert. Diese Mutante zeigte das beschriebene, höhere basale Aktivitätsniveau (Prescott, 2003), womit in F11-hMrgX1-Zellen möglicherweise PIP₂-Konzentrationen mit inhibitorischer Wirkung auf den TRPV1 vorliegen (vgl. Abbildung 5.46). Ausgehend von einer erhöhten basalen Aktivität der TRPV1- δ 777-820-Mutante war der hMrgX1-Rezeptor weniger gut in der Lage (vgl. Abbildung 5.47), den TRPV1 direkt zu aktivieren (~40 %). Somit konnte auch die Beteiligung des PLC- β -vermittelten PIP₂-Abbaus an der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung nachgewiesen werden.

Schließlich wurde mit einer DAG- und PIP₂-bindungsdefizienten TRPV1-Mutante (TRPV1-Y511A-8777-820) evident, dass beide molekularen Signaltransduktionswege ausreichend sind, um die hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung mechanistisch zu erklären. So glichen sich die Ca²⁺-Signale von F11-hMrgX1-Zellen und F11-hMrgX1-Zellen, die den TRPV1-Y511A-8777-820 ko-exprimieren, phänotypisch (vgl. Abbildung 5.50). Damit konnte der hMrgX1-vermittelte Signaltransduktionsweg der direkten TRPV1-Aktivierung durch chemische Inhibitoren und genetische Modifikationen des TRPV1-Proteins vollständig aufgeklärt werden.

6.4.3 Unterschiede zwischen hMrgX1-vermittelter Sensibilisierung und Aktivierung des TRPV1

Im Rahmen dieser Arbeit wurden distinkte Signalwege für die hMrgX1-vermittelte Sensibilisierung und Aktivierung des TRPV1-Ionenkanals ermittelt. Während die Sensibilisierung des TRPV1 über eine PKC-vermittelte Phosphorylierung an Serin 502 und 800 vermittelt wurde (Abschnitt 6.4.1), wurde die direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor nicht über die PKC, sondern über eine Modulation der PLC- β -Aktivität, resultierend in der Produktion des endogenen TRPV1-Aktivators DAG und der Degradation des tonisch-inhibierenden PIP₂, induziert (Abschnitt 6.4.2). Eine TRPV1-Aktivierung durch GPCR wurde zwar bislang diskutiert, ist allerdings im Gegensatz zur TRPV1-Sensibilisierung nicht als gängiges Konzept wie bei TRPC-Kanälen etabliert (Gudermann, 2004). Da im Rahmen dieser Arbeit distinkte Signalwege für die duale Regulation des TRPV1 definiert werden konnten, wurden somit erstmals TRPV1-Aktivierung und -Sensibilisierung als unabhängige Prozesse der Modulation des TRPV1-Aktivität durch einen GPCR nachgewiesen.

Der TRPV1 stellt eine interessante Zielstruktur für eine analgetische Therapie dar und die Effektivität von TRPV1-Antagonisten konnte bereits in verschiedenen Schmerzmodellen *in vivo* unter Beweis gestellt werden (Jara-Oseguera, 2008, Vay, 2012). Dabei wurden allerdings auch ungewünschte Wirkungen beobachtet. Die schwerwiegendste dieser Nebenwirkungen stellt eine deutliche Erhöhung der Körperkerntemperatur (Hyperthermie) dar, die insbesondere durch die Wirkung auf TRPV1-Proteine im zentralen Nervensystem vermittelt wird (Gavva, 2007, Swanson, 2005). Das Auftreten der Hyperthermie konnte interessanterweise mit der Fähigkeit eines TRPV1-Antagonisten korreliert werden, die Protonen-induzierte TRPV1-Aktivierung zu blockieren (Garami, 2010). Dass die hMrgX1-vermittelte Sensibilisierung des TRPV1 gegenüber Protonen und die direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor bei einem pH-Wert von 7,4 molekular separiert werden konnten, deutet möglicherweise auf molekular distinkte Konformationen von Protonen- bzw. DAG/PIP₂-aktivierten TRPV1-Molekülen hin. Mit diesem besseren Verständnis der

TRPV1-Funktion könnte es zukünftig möglich sein, die rationale Generierung von TRPV1-Antagonisten mit erhaltener analgetischer Potenz, aber deutlich abgeschwächten hyperthermischen Nebenwirkungen zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Arbeit konnten molekulare Begründungen für die distinkten TRPV1-sensitisierenden bzw. -aktivierenden Signalwege ausgehend vom hMrgX1-Rezeptor nicht geliefert werden. Durchaus denkbar wäre beispielsweise eine distinkte Aktivierung unterschiedlicher PKC-Isoformen durch den hMrgX1-Rezeptor alleine (Aktivierung) bzw. in Kombination mit dem TRPV1-Ionenkanal (Sensitisierung). Für klassische PKC-Isoformen, z. B. die PKC α , und für nicht-klassische PKC-Isoformen, beispielsweise die PKC ϵ , ist beiderseits eine Phosphorylierung des TRPV1 ermittelt worden (Numazaki, 2002, Olah, 2002). Im vorliegenden System könnte postuliert werden, dass die Aktivierung des hMrgX1-Rezeptors zwar genügend DAG produziert, um nicht-klassische PKC-Isoformen wie die PKC ϵ zu aktivieren, allerdings zu keiner genügenden Erhöhung der zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration führt, um zusätzlich auch klassische PKC-Isoformen wie die PKC α zu aktivieren. Bei einer strikten Abhängigkeit der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Modulation von der PKC α wäre also die TRPV1-Aktivierung auf Grund der fehlenden PKC α -Aktivierung PKC-unabhängig. Bei der Analyse der TRPV1-Sensitisierung wird die zytoplasmatischen Ca^{2+} -Konzentration durch die Liganden-induzierte Aktivierung des TRPV1 allerdings deutlich erhöht, so dass nun auch klassische PKC-Isoformen aktiviert werden und der sofort beginnenden TRPV1-Desensitisierung (Rosenbaum, 2004, Schwarz, 2000) entgegen wirken. Entsprechend könnte im Resultat eine PKC-abhängige TRPV1-Sensitisierung durch den hMrgX1-Rezeptor resultieren. Diese Hypothese wird unterstützt, da die direkte TRPV1-Aktivierung durch einen PKC-Aktivator in PKC ϵ -defizienten Zellen unverändert stattfand und mit der Expressionsstärke der PKC α korreliert werden konnte (Olah, 2002). Ebenso übereinstimmend wurde determiniert, dass die rMrgC-induzierte TRPV1-Sensitisierung in primären Spinalganglienneuronen PKC-abhängig war, eine Beteiligung der PKC ϵ , nicht aber der PKC α , konnte hier jedoch ausgeschlossen werden (Honan, 2007).

In weiteren Studien sollte versucht werden, molekulare Begründungen für die distinkten Signalwege der Sensitisierung und Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor im Besonderen und durch GPCR im Allgemeinen zu liefern. Dabei wäre es wünschenswert der Beteiligung distinkter PKC-Isoformen nachzugehen. Die Ergebnisse sollten nicht nur helfen, Signalwege von GPCR besser zu verstehen, sondern zudem zur rationalen Entwicklung TRPV1-abhängiger Wirkstoffe beitragen.

6.4.4 Unterschiede zwischen hMrgX1- und B2R-induzierter Aktivierung des TRPV1

Die hMrgX1-vermittelte Sensitisierung des TRPV1 stimmte in Bezug auf den zu Grunde liegenden Signalweg mit dem vieler anderer GPCR überein. Da die direkte TRPV1-Aktivierung durch einen GPCR bislang nur für vier verschiedene Rezeptoren postuliert wurde (Chuang, 2001, Kim, 2009b, Shim, 2007, Shin, 2002, Woo, 2008), ist eine Einordnung des hMrgX1-induzierten TRPV1 aktivierenden Signalweges innerhalb bislang analysierter GPCR-vermittelter TRPV1 aktivierender Signalwege wenig sinnvoll. Es kann jedoch darauf hingewiesen werden, dass die Beteiligung von DAG ebenso für den mGluR5 und den M1R nachgewiesen und eine Beteiligung von PIP₂ für den B2R postuliert wurde (Chuang, 2001, Kim, 2009b, Shin, 2002, Woo, 2008).

Da die direkte TRPV1-Aktivierung vom genutzten zellulären System abhing (vgl. Diskussion der aktivierenden Wirkung von DAG und inhibierenden Wirkung von PIP₂; Abschnitt 6.4.2), wurde im Rahmen dieser Arbeit in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen untersucht, ob der B2R den TRPV1 ebenfalls direkt aktivieren kann und ob die genutzten Signalwege mit dem hMrgX1-Rezeptor übereinstimmen. Es zeigte sich auch für Bradykinin eine direkte Aktivierung des TRPV1 (vgl. Abschnitt 5.3.4), womit die direkte TRPV1-Aktivierung bei RT und pH 7,4 möglicherweise einen typischen Signalweg G_{q/11}-koppelnder GPCR in F11-Zellen darstellt. In Bezug auf die Signaltransduktionskomponenten zwischen GPCR und TRPV1 konnten zudem Übereinstimmungen bei der Abhängigkeit von DAG-Produktion und PIP₂-Degradation ermittelt werden (vgl. Abbildung 5.55). Allerdings war die B2R-vermittelte TRPV1-Aktivierung zusätzlich von der Aktivität der PKC und der Lipoxygenase abhängig (vgl. Abbildung 5.53 und Abbildung 5.54). Zunächst wurden damit Daten aus der Literatur bestätigt (Chuang, 2001, Shin, 2002), nach denen die B2R-vermittelte TRPV1-Aktivierung von der Degradation von PIP₂ und der Aktivität der Lipoxygenase abhängt, was das genutzte Zellmodell auch in Bezug auf die Analyse der direkten TRPV1-Aktivierung durch GPCR validiert.

Bei der genauen Analyse der Auswirkung der Ablation der DAG- oder PIP₂-Bindestelle zeigte sich, dass die B2R-vermittelte TRPV1-Aktivierung jeweils deutlich stärker inhibiert wurde, als die hMrgX1-vermittelte. Damit kann man von konvergierenden Signalwegen, ausgehend vom hMrgX1-Rezeptor, und von divergierenden Signalwegen, ausgehend vom B2R sprechen. In Bezug auf die TRPV1- $\delta 777$ -820-Mutante könnte eine mögliche Erklärung für diesen Befund der Tatbestand sein, dass sich die PKC-Phosphorylierungsstelle Serin 800 innerhalb der deletierten Region befindet und diese Mutante nach Stimulation mit Bradykinin die kumulierte Inhibition aus fehlender Disinhibition durch PIP₂-Degradation und fehlender aktivierender Phosphorylierung durch die PKC anzeigt.

Weitere molekulare Begründungen für die ermittelten Unterschiede zwischen hMrgX1- und B2R-induzierter TRPV1-Aktivierung müssen in folgenden Arbeiten analysiert werden. Dabei könnte beispielsweise der Frage einer distinkten Stabilisierung der Interaktion des *A kinase anchoring protein* (AKAP) mit dem TRPV1 durch Bradykinin bzw. BAM8-22 nachgegangen werden, der bereits *in vitro* und *in vivo* eine Bedeutung bei der Sensitisierung des TRPV1 zugewiesen werden konnte (Jeske, 2009, Zhang, 2008). So könnte überprüft werden, ob der B2R in der Lage ist, über die Stabilisierung des Komplexes aus AKAP und TRPV1 zu einer PKC-vermittelten TRPV1-Aktivierung zu führen, während dem hMrgX1-Rezeptor dieser Regulationsweg fehlt.

Weiterhin wäre es interessant, die aktivierende Wirkung andere GPCR auf den TRPV1 bei RT und pH 7,4 zu analysieren, um den TRPV1 als metabotrop regulierten Ionenkanal zu etablieren. Bei diesen Untersuchungen wäre ein TRPV1 endogen exprimierendes Zellsystem wünschenswert, zudem sollten die genauen molekularen Signaltransduktionswege zwischen GPCR und TRPV1 vergleichend analysiert werden. Möglicherweise könnte es dadurch möglich werden, die TRPV1-Aktivierung durch einen bestimmten GPCR oder durch eine große Gruppe bzw. sogar alle G_{q/11}-koppelnde GPCR selektiv zu inhibieren, so dass zukünftig maßgeschneiderte Wirkstoffe für verschiedene Schmerzsyndrome zur Verfügung stehen könnten.

6.5 hMrgX1-vermittelte Induktion schmerzrelevanter Gene

Die physiologische Wahrnehmung von Schmerzen wird von der *International Association for the Study of Pain* als Empfindung in Konsequenz einer Aktivierung primär-sensorischer, afferenter Neurone mit hoher Reizschwelle durch tatsächlich oder potentiell gewebeschädliche Stimuli beschrieben (Merskey, 1994b). Diese Empfindung ist unangenehm und in ihrer Dauer strikt an das Vorhandensein des Stimulus gekoppelt. Davon unterschieden werden chronische Schmerzsyndrome, die sich durch das andauernde Auftreten spontaner Schmerzen, eine Verminderung der nozizeptiven Reizschwelle (Allodynie) sowie ein gesteigertes Schmerzempfinden bei gleichen Stimuli (Hyperalgesie) auszeichnen (Costigan, 2009). Eine andauernde Entzündung löst dabei chronisch-inflammatorische Schmerzen aus, deren physiologischer Nutzen in einer Beschleunigung der Heilung und Reparatur des geschädigten Gewebes besteht, beispielsweise durch eine Verringerung der mechanischen Beanspruchung des Gewebes auf Grund einer Schonhaltung (Huang, 2006). Typischerweise dauern inflammatorische Schmerzen nach Beendigung der Entzündungsreaktion nicht weiter an, so dass von einem adaptiven aber reversiblen Prozess gesprochen werden kann. Neuropathische Schmerzen werden durch eine Läsion oder Dysfunktion des somatosensorischen Systems ausgelöst und nach dem Ort der primären Läsion in neuropathische Schmerzen peripherer oder zentraler Genese unterschieden (Merskey, 1994a). Periphere neuropathische Schmerzen werden beispielsweise durch ein mechanisches Trauma, durch metabolische Erkrankungen wie Diabetes mellitus, durch neurotoxische Chemikalien, durch Infektionen oder durch Tumorinvasion ausgelöst (Dworkin, 2003). Im Unterschied zu inflammatorischen Schmerzen haben neuropathische Schmerzen keinen physiologischen Nutzen für einen Organismus und sind daher als maladaptiver, häufig irreversibler Prozess oder vielmehr als Erkrankung des somatosensorischen Systems im engeren Sinne anzusehen (Costigan, 2009).

Die Chronifizierung von Schmerzen ist unabhängig von verschiedenen Ätiologien in Bezug auf die zu Grunde liegenden Mechanismen, insbesondere Vorgänge im primär-sensorischen, nozizeptiven Neuron, häufig ähnlich. Ein wichtiger Prozess ist dabei dessen periphere Sensitisierung (vgl. Abschnitt 3.1.6) durch verschiedene Immunmediatoren (Binshtok, 2008). Diese periphere Sensitisierung äußert sich ultimativ in einer erhöhten elektrischen Erregbarkeit (Costigan, 2009). Einerseits resultiert daraus eine hyperalgetische Antwort nach der Detektion eines noxischen Stimulus im peripheren Ende des Nozizeptors. Andererseits kann es jedoch auch zur ektopen Reizbildung vor allem in primär geschädigten Bereichen des Axons und im Soma des Nozizeptors kommen (Amir, 2005, Wu, 2002). Auf molekularer Ebene sind die transkriptionelle und posttranslationale Modifikation verschiedener Ionenkanäle, u.

a. von spannungsabhängigen Na^+ -Kanälen, TRP-Kanälen, Ca^{2+} -aktivierten K^+ -Kanälen und spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen bzw. deren regulatorischen $\alpha 2\delta$ -Untereinheiten als entscheidende Mechanismen der peripheren Schmerzchronifizierung identifiziert worden (Ekberg, 2006, Hains, 2003, Hoyt, 2007, Jarvis, 2007, Jin, 2006, McGivern, 2006, Saegusa, 2001, Sarantopoulos, 2007, Zhu, 2007). Weiterhin wurde evident, dass die Interaktion des Immunsystems mit den Nozizeptoren, insbesondere die Freisetzung von Mediatoren aus Immunzellen und deren aktivierende Wirkung auf die Nozizeptoren, maßgeblich am Prozess der peripheren Schmerzchronifizierung beteiligt ist (Scholz, 2007, White, 2007).

Die medikamentöse Therapie chronischer Schmerzen ist bislang wenig erfolgreich (Dworkin, 2010), da ein hoher Anteil an Patienten keine und die restlichen Patienten in der Regel nur eine partielle Minderung der Schmerzen erfährt. Bislang wird in der Therapie auf eine Aktivitätsmodulation von nur drei verschiedenen molekularen Zielstrukturen hingewirkt. Trizyklische Antidepressiva und selektive Serotonin/Noradrenalin-Wiederaufnahmehemmer sollen die Konzentration von Serotonin und Noradrenalin in Synapsen zwischen deszendierenden Schmerz-inhibierenden Hirnstammneuronen und deren Zielstrukturen im spinalen Hinterhorn erhöhen (Matsuzawa-Yanagida, 2008), um dem Prozess der Disinhibition nozizeptiver Bahnen entgegenzuwirken. Gabapentin und dessen Derivate inhibieren die Interaktion von spannungsabhängigen Ca^{2+} -Kanälen mit ihrer regulatorischen $\alpha 2\delta$ -Untereinheit und verhindern somit die effektive Insertion der Kanäle in die Membran, was in einer reduzierten synaptischen Transmission zwischen Nozizeptor und sekundären nozizeptiven Neuronen resultiert (Hendrich, 2008). Schließlich werden Opioide eingesetzt (Dworkin, 2010, Pan, 2008), um der Disinhibition und peripheren Sensibilisierung entgegenzuwirken (vgl. Abschnitt 3.1.6). Somit kann konstatiert werden, dass die monokausale Therapie einzelner Merkmale eines ausgebildeten chronischen Schmerzsyndroms keine ausreichende analgetische Wirkung zeigt. Vielmehr ist es wichtig, die molekularen Abläufe der Schmerzchronifizierung besser zu verstehen, um zukünftig in diesen Prozess inhibierend eingreifen zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Fähigkeit des hMrgX1-Rezeptors, transkriptionelle Prozesse zu regulieren, vor dem Hintergrund der besonderen Bedeutung der transkriptionellen Regulation im Zuge der Schmerzchronifizierung analysiert. So konnte die hMrgX1-vermittelte Aktivierung eines Signalwegs über Erk-1/2, ELK-1 und Srf etabliert werden, über den etablierte Markergene inflammatorischer Schmerzen induziert werden. Weiterhin wurde eine Aktivierung von NFAT über Calcineurin ermittelt, die in der Induktion des neuropathischen Markergens CCR2 resultierte. Da zusätzlich hMrgX1-vermittelt der CCR2-Agonist CCL2 aus Mastzellen freigesetzt wird, konnte damit eine neue Signalschleife zwischen

Nozizeptoren und Mastzellen etabliert werden, deren besondere Bedeutung bei der peripheren Schmerzchronifizierung unumstritten ist.

6.5.1 Aktivierung von Erk-1/2-abhängiger Transkription durch den hMrgX1-Rezeptor

In dieser Arbeit wurde erstmals die Aktivierung von Erk-1/2 durch den hMrgX1-Rezeptor in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen beschrieben (vgl. Abschnitt 5.4.1.1). Als Nachweis für die Aktivierung der Kinase wurde deren aktivierende Phosphorylierung an Tyrosin 204 bzw. 187 (Rubinfeld, 2005) mittels eines Phosphospezifischen Antikörpers im Immunoblot nachgewiesen. Dabei zeigte sich eine schnelle Erk-1/2-Aktivierung, die im Bereich von 2,5 bis 5 Minuten ihren Höhepunkt hatte und danach innerhalb der folgenden 25 Minuten wieder auf den basalen Wert zurückgeführt wurde. Da beispielsweise die Erk-1/2-Aktivierung durch den Angiotensin-2-Rezeptor in eine schnelle, eher transiente G-Protein-abhängige sowie eine langsame, andauernde G-Protein-unabhängige Phase unterteilt werden kann (Ahn, 2004, DeWire, 2007), deutet dieser kinetische Befund eher auf eine G-Protein-abhängige Erk-1/2-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor hin. Zudem wurde in einer Konzentration-Wirkungskurve für die Erk-1/2-Aktivierung ein ähnlicher EC_{50} -Wert gemessen, wie bei der Ca^{2+} -Mobilisation, womit die Erk-1/2-Aktivierung wahrscheinlich Ca^{2+} -abhängig vermittelt wird. Mechanistisch ist für eine Ca^{2+} -abhängige Erk-1/2-Aktivierung am wahrscheinlichsten eine PKC-vermittelte Aktivierung von c-Raf (Gudermann, 2000), der ersten Kinase innerhalb der Erk-1/2-spezifischen MAPK-Kaskade, anzunehmen.

Erk-1/2 sind klassischerweise als wichtige molekulare Determinanten proliferativer Prozesse bekannt (Meloche, 2007). Insofern passt die hier ermittelte hMrgX1-induzierte Erk-1/2-Aktivierung gut zur deutlichen Induktion proliferativer Prozesse in 3T3-Fibroblasten nach Transfektion des hMrgX1-Rezeptors (Burstein, 2006). Da Nozizeptoren terminal differenzierte, teilungsunfähige Zellen darstellen, ist die Induktion der Proliferation sicherlich nicht als physiologische Funktion des hMrgX1-Rezeptors in Spinalganglienneuronen anzusehen. Vielmehr sind in Neuronen Erk-1/2-abhängige Transkriptionsfaktoren etabliert worden, deren Modulation an der Stimulus-abhängigen plastischen Veränderung dieser Zellen beteiligt ist. In dieser Arbeit wurde exemplarisch die hMrgX1-induzierte Modulation der Transkriptionsfaktoren CREB und Srf analysiert (Knoll, 2009, Shaywitz, 1999). In HEK293-hMrgX1- und in F11-hMrgX1-Zellen wurden Srf-, nicht aber CREB-abhängige Reportergenkonstrukte durch BAM8-22 aktiviert (vgl. Abschnitt 5.4.1.2). Damit konnte dem hMrgX1-Rezeptor erstmals die Fähigkeit zur Genregulation zugeordnet werden. Die genauere Analyse der hMrgX1-vermittelten Srf-abhängigen Transkription ergab, dass dieser Signalweg über Erk-1/2 vermittelt wird und

höchstwahrscheinlich ELK-1 als Heterodimerisierungspartner von Srf (Cen, 2003, Buchwalter, 2004) involviert ist.

Srf ist als Transkriptionsfaktor von einer großen Anzahl unterschiedlicher Gene in Neuronen beschrieben worden (Knoll, 2009). Beispielsweise wird der Promoter verschiedener Transkriptionsfaktoren der IEG-Familie oder verschiedener Proteine des Aktinzytoskelettes und der Axon-Wegfindung durch Srf gebunden (Etkin, 2006, Knoll, 2006, Ramanan, 2005). Im Rahmen dieser Arbeit wurde auf mRNA-Ebene exemplarisch die Erk-1/2-abhängige transkriptionelle Regulation verschiedener IEG-Transkriptionsfaktoren untersucht (vgl. Abschnitt 5.4.1.3). Insgesamt wurden 15 verschiedene IEG untersucht, von denen c-Fos und EGR-1 durch BAM8-22 induziert wurden, während die anderen Gene nicht reguliert wurden. Die Induktion beider Gene konnte durch die vorherige Inkubation mit einem Erk-1/2-Inhibitor (genauer einem Inhibitor der Erk-1/2-aktivierende Kinase MKK1) komplett blockiert werden. Die Induktion von EGR-1-Transkripten konnte in F11-hMrgX1-Zellen auf Proteinebene bestätigt werden. Außerdem wurde in hMrgX1-Rezeptor transient-exprimierenden primären Spinalganglienneuronen die Aktivierung von Erk-1/2-induzierter TCF/Srf-abhängiger Transkription sowie die Erk-1/2-abhängige EGR-1-mRNA-Induktion bestätigt (vgl. Abschnitt 5.4.1.4). Die Signalstärke der EGR-1-Induktion durch den hMrgX1-Rezeptor lag im Vergleich mit der Literatur z. T. etwas unterhalb (Utreras, 2009), teilweise jedoch auch im Bereich bereits beobachteter EGR-1-Induktionen durch andere Stimuli (Katayama, 1993), so dass in weiteren Studien geklärt werden muss, welche Funktionen von der hMrgX1-vermittelten EGR-1-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen moduliert werden. Der endgültige Beweis für eine Beteiligung von ELK-1/Srf an der Induktion von c-Fos und EGR-1 muss noch erbracht werden. Allerdings kann ein solcher Signalweg aufgrund der Ko-Inzidenz der BAM8-22-vermittelten Erk-1/2-induzierten Srf-abhängigen Transkription, Aktivierung von ELK-1 und Erk-1/2-abhängigen Induktion der c-Fos/EGR-1-mRNA durchaus angenommen werden.

Das IEG c-Fos gilt in sekundär nozizeptiven Neuronen des spinalen Hinterhorns seit vielen Jahren als guter Aktivitätsmarker für nozizeptive Perzeption, nicht aber für andere somatosensorische Modalitäten (Bullitt, 1989). Kürzlich konnte allerdings auch in nozizeptiven Spinalganglienneuronen eine Induktion von c-Fos mit einer noxischen Reizung korreliert werden. So wurde die c-Fos-Induktion in Katzen nach Elektroakupunktur (Wang, 2006) und in Mäusen nach einer Nervenquetschung (Su, 2010) beobachtet. Außerdem zeigte sich eine additive Erk-1/2-abhängige c-Fos-Induktion in einem postoperativen Schmerzmodell unter paralleler Applikation von Remifentanyl (Romero, 2012). Da die Blockade der c-Fos-Induktion durch einen Erk-1/2-Inhibitor in einer verminderten Allodynie resultierte (Romero, 2012), kann die c-Fos-Induktion in nozizeptiven Spinalganglienneuronen nicht nur als Aktivierungsmarker angesehen werden, sondern sie ist in den untersuchten

Modellsystemen auch kausativ an der plastischen Ausbildung eines chronischen Schmerzsyndroms beteiligt.

Die Induktion von EGR-1 in nozizeptiven Spinalganglienneuronen ist bereits mit der Entwicklung chronisch-inflammatorischer Schmerzen unter Nutzung des etablierten Karrageen-Modells korreliert worden (Utreras, 2009). Eine genauere Analyse ergab, dass im Zuge der inflammatorischen Antwort im Gewebe die Konzentration des Zytokins TNF α ansteigt. TNF α wiederum aktiviert über Rezeptoren der TNF α -Rezeptor Superfamilie in nozizeptiven Spinalganglienneuronen einen Erk-1/2-abhängigen Signaltransduktionsweg, der zur Induktion von EGR-1 führt (Utreras, 2009). EGR-1 fungiert sodann als Transkriptionsfaktor von p35 (Utreras, 2009), dem limitierenden Ko-Faktor der *Cyclin-dependent kinase 5* (Takahashi, 2005), welche wiederum als entscheidende molekulare Determinante bei der Entwicklung inflammatorisch-chronischer Schmerzen identifiziert werden konnte (Pareek, 2007, Pareek, 2006a, Pareek, 2006b, Saikkonen, 2008). Die besondere Bedeutung von EGR-1 für die Entwicklung inflammatorischer Schmerzen konnte in EGR-1-defizienten Mäusen nachgewiesen werden, die eine verminderte Schmerzrate in der späten Phase des Formalin-Testes sowie eine reduzierte mechanische Allodynie nach der Injektion von komplettem Freund'schem Adjuvans zeigten (Ko, 2005).

In zukünftigen Arbeiten wird es interessant sein zu überprüfen, welche Zielgene distal von c-Fos und EGR-1 durch die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors induziert werden. Dabei könnte ein Vergleich mit bereits etablierten Induktoren beider Transkriptionsfaktoren interessant sein, um spezifische Effekte des hMrgX1-Rezeptors zu ermitteln.

6.5.2 Aktivierung von NFAT-abhängiger Transkription durch den hMrgX1-Rezeptor

Diese Arbeit liefert zusätzlich zur Induktion TCF/Srf-abhängiger Transkriptionsprozesse erstmals Evidenzen für eine hMrgX1-induzierte Aktivierung des Transkriptionsfaktors NFAT (vgl. Abschnitt 5.4.2.1 und 5.4.2.3). So konnte unter Nutzung eines NFAT-spezifischen Reportergenkonstruktes in HEK293-hMrgX1 und F11-hMrgX1-Zellen sowie in hMrgX1-Rezeptor transient-exprimierenden, primären Spinalganglienneuronen gezeigt werden, dass BAM8-22 über die Ca²⁺/Calmodulin-abhängige Phosphatase Calcineurin (Li, 2011) zur Aktivierung von NFAT führt. Im humanen Genom existieren vier NFAT-Isoformen (NFATc1-4), die durch Calcineurin aktiviert werden können (Nguyen, 2008). In F11-hMrgX1-Zellen werden auf mRNA-Ebene vor allem NFATc1 und NFATc3 exprimiert (vgl. Abbildung 5.69), was in guter Übereinstimmung mit früheren Befunden aus F11-Zellen und primären Spinalganglienneuronen steht (Jung, 2008a). Damit könnte postuliert werden, dass diese

beiden NFAT-Isoformen für die hMrgX1-induzierten Calcineurin-abhängigen Funktionen verantwortlich sind, dies muss jedoch in zukünftigen Arbeiten genauer analysiert werden.

Ursprünglich wurde NFAT als Transkriptionsfaktor in T Lymphozyten identifiziert (Shaw, 1988), der bedeutsam an der Regulation der T Zellaktivierung, -entwicklung, -differenzierung und Selbsttoleranz beteiligt ist (Macian, 2005). Mittlerweile wurde die Expression von NFAT auch in anderen Geweben nachgewiesen, beispielsweise wird über Calcineurin und NFAT in Kardiomyozyten eine hypertrophe Umgestaltung initiiert, welche schließlich in einer Herzinsuffizienz resultieren kann (Zarain-Herzberg, 2011). Seit wenigen Jahren ist bekannt, dass NFAT auch im neuronalen System exprimiert wird (Graef, 1999, Jung, 2008a, Kim, 2009a, Seybold, 2006, Jackson, 2007). In Spinalganglienneuronen konnte einerseits gezeigt werden, dass NFAT durch die elektrische Aktivierung eines Neurons, wahrscheinlich durch einen Ca^{2+} -Einstrom durch spannungsabhängige Ca^{2+} - oder nicht-selektive Kationenkanäle, aktiviert wird (Jung, 2008a, Kim, 2009a). Andererseits wurde deutlich, dass NFAT in Spinalganglienneuronen ebenso durch eine intrazelluläre Ca^{2+} -Mobilisation über $\text{G}_{q/11}$ -koppelnde GPCR oder Rezeptortyrosinkinasen aktiviert werden kann (Groth, 2007, Jackson, 2007). Damit fügt sich die in dieser Arbeit beobachtete NFAT-Aktivierung durch den hMrgX1-Rezeptor gut in bislang publizierte Daten ein.

Interessanterweise sind auf Ebene der Spinalganglienneurone mit BDNF, COX-2 und CCR2 drei NFAT-abhängige Zielgene identifiziert worden (Groth, 2007, Jackson, 2007, Jung, 2008a), denen jeweils eine Funktion bei der Schmerzchronifizierung zugeordnet werden konnte (Ma, 2012, Obata, 2006, White, 2007). Damit könnte die Aktivierung von NFAT durch den hMrgX1-Rezeptor bereits eine Beteiligung an der Schmerzchronifizierung implizieren. Auf der Suche nach Zielgenen, die nach Stimulation mit BAM8-22 in F11-hMrgX1-Zellen über NFAT induziert werden, wurde im Rahmen dieser Arbeit die hMrgX1-vermittelte Induktion von IP3R-1 und CCR2, aber nicht von COX-2 oder BDNF, auf mRNA-Ebene ermittelt (vgl. Abschnitt 5.4.2.2).

Der IP3R-1 wird in verschiedenen neuronalen Systemen über NFAT induziert, beispielsweise in Neuronen des Hippocampus, Rückenmarks, Spinalganglions und Kleinhirns (Genazzani, 1999, Groth, 2003). In diesen Arbeiten wurde die Signalstärke der IP3R-1-Induktion jedoch nicht quantifiziert, so dass die hier ermittelte Induktion in ihrer Größenordnung nicht in die Literatur eingeordnet werden kann. Zudem konnte der IP3R-1-Induktion bislang keine Bedeutung im Rahmen von physiologischen oder pathophysiologischen Prozessen des jeweiligen neuronalen Systems zugeordnet werden, so dass die NFAT-abhängige IP3R-1-Induktion durch den hMrgX1-Rezeptor vor allem als technisch unabhängige Reproduktion der Ergebnisse aus den Reporterstudien

aufgefasst werden kann. In zukünftigen Studien wird es interessant sein, der IP3R-1-Induktion eine Funktion zuzuweisen.

Der Induktion des CCR2 in nozizeptiven Spinalganglienneuronen wurde eine wichtige Rolle bei der Schmerzchronifizierung zugeordnet (White, 2007), so dass die hMrgX1-vermittelte CCR2-Induktion im Rahmen dieser Arbeit genauer untersucht wurde. Zunächst konnte in durchflusszytometrischen Experimenten gezeigt werden, dass die BAM8-22-vermittelte Erhöhung von CCR2-Transkripten in eine vermehrte Translation des CCR2-Proteins übersetzt wird (vgl. Abbildung 5.73). Dies ist von Interesse, da die hier ermittelte Induktion des CCR2 auf mRNA-Ebene ($2,1 \pm 0,2$ -fach) in Bezug auf die Signalstärke eher gering ausfiel. Allerdings kann darauf hingewiesen werden, dass die artifizielle Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration durch Ionomycin oder K^{+} -induzierte Depolarisation in F11-Zellen ebenfalls nur in einer 2 bis 3-fachen Erhöhung der CCR2-mRNA bzw. Aktivierung eines CCR2-Promoter-abhängigen Reportergenkonstruktes resultierte (Jung, 2008a). Zudem führte die Induktion des CCR2-Proteins durch BAM8-22 zur Vermittlung einer Sensitivität der Zellen für den CCR2-Agonisten CCL2 (Murphy, 2002), die zum einen in der Inhibition von AC und zum anderen in der Aktivierung der Erk-1/2 resultierte (vgl. Abbildung 5.74 und Abbildung 5.75). Die AC-Inhibition erreichte dabei ein typisches Maß für einen $\text{G}_{i/o}$ -koppelnden GPCR in F11-Zellen (Rothe, 2012) und außerdem wurde nachgewiesen, dass eine CCR2-Proteinzunahme um 20 bis 40 % positiv mit Atherosklerose nach einem Kawasaki-Syndrom (nekrotisierende Vaskulitis im Kindesalter) korrelierte (Cheung, 2005). AC und Erk-1/2 sind beiderseits bereits als Zielstrukturen des CCR2 etabliert worden (Myers, 1995, Ashida, 2001), so dass hMrgX1-induzierte CCR2-Proteine keine abberanten funktionale Eigenschaften aufweisen. Außerdem konnte die Calcineurin-abhängige CCR2-Induktion auf mRNA-Ebene auch in hMrgX1-Rezeptor-exprimierenden primären Spinalganglienneuronen bestätigt werden (vgl. Abbildung 5.77). Bislang war eine NFAT-abhängige CCR2-Induktion nur durch die artifizielle Erhöhung der intrazellulären Ca^{2+} -Konzentration in F11-Zellen oder primären Spinalganglienneuronen ermittelt worden (Jung, 2008a). Da physiologischere Stimuli, insbesondere GPCR-Agonisten, bislang nicht als CCR2-Induktoren beschrieben wurden, ist BAM8-22 also der erste physiologische Stimulus, durch den der CCR2 über NFAT in Spinalganglienneuronen induziert wird.

Die Induktion des CCR2 wurde im Rahmen verschiedener neuropathischer Schmerzmodelle in nozizeptiven Spinalganglienneuronen beobachtet. So wurde in einem Infektionsmodell (humanes Immundefizienz-Virus), in verschiedenen mechanischen Traumamodellen (Konstriktion von Spinalnerv, Spinalganglion oder peripherem Nerv) oder in einem Modell peripherer Demyelinisierung (Lysolezithin) jeweils die Induktion des CCR2 im Spinalganglion ermittelt und mit dem entstandenen neuropathischen Schmerzsyndrom korreliert (Abbadie, 2003, Bhangoo, 2007, Bhangoo,

2009, Fu, 2010, Serrano, 2010, Sun, 2006, Wang, 2010). Die kausative Beteiligung des CCR2 an der Entwicklung dieses Schmerzsyndroms konnte belegt werden, da CCR2-Antagonisten hyperalgetische und allodynsche Schmerzantworten vermindern konnten (Bhangoo, 2007, Serrano, 2010) und da in CCR2-defizienten Mäusen nur eine abgeschwächte Entwicklung des neuropathischen Schmerzes evident wurde (Abbadie, 2003). Schließlich konnte in einem eleganten doppelt-transgenen Reporteransatz in Mäusen gezeigt werden, dass die CCR2-Induktion in nozizeptiven Spinalganglienneuronen und die dortige Signaltransduktion entscheidend für die Entwicklung des neuropathischen Schmerzes ist (Jung, 2009), so dass die Verhinderung dieser Induktion eine interessante, neue Strategie zur analgetischen Pharmakotherapie darstellt.

Die zellulären Mechanismen, über welche der CCR2 auf molekularer Ebene ein neuropathisches Schmerzsyndrom induziert, sind bislang wenig untersucht worden. Allerdings konnte festgestellt werden, dass die Stimulation von primär-nozizeptiven Spinalganglienneuronen mit CCL2 nach Anwendung eines neuropathischen Schmerzmodells zur Inhibition spannungsabhängiger K⁺-Kanäle (Sun, 2006, Wang, 2010) und zur Aktivierung nicht-selektiver Kationenkanäle führt (Sun, 2006). Mögliche Kandidaten nicht-selektiver Kationenkanäle könnten Ionenkanäle der TRP-Superfamilie darstellen, da in heterologen Expressionssystemen gezeigt werden konnte, dass der CCR2 den TRPV1 und den TRPA1 sensibilisieren kann (Jung, 2008b). Eine genauere Analyse dieser funktionellen Interaktion unter neuropathischen Bedingungen ist aber bislang noch nicht erfolgt. Schließlich wurde vorgeschlagen, dass der CCR2 in der Lage ist, die analgetisch wirkenden μ -Opioidrezeptoren heterolog zu desensibilisieren (Zhang, 2004). Somit stehen in der Zukunft verschiedene Signaltransduktionskomponenten zur Verfügung, deren funktionelle Modulation durch CCL2 in BAM8-22-stimulierten und nicht stimulierten Zellen untersucht werden kann, um hMrgX1-induzierte Signalwege, die möglicherweise zur neuropathischen Schmerzchronifizierung führen, besser verstehen und daraus neue therapeutische Strategien ableiten zu können.

Im Rahmen dieser Arbeit wurde der hMrgX1-Rezeptor als erster GPCR identifiziert, der über NFAT zu einer Induktion des CCR2 in neuronalen Zellen führt. Zur besseren Einordnung dieses Befundes wurde außerdem überprüft, ob dieser Befund spezifisch für den hMrgX1-Rezeptor ist, oder ob ein neuer Signalweg identifiziert werden konnte, der auch von anderen pro-algetisch wirkenden GPCR angestoßen werden kann. Daher wurde die CCR2-Induktion durch den B2R, der in F11-hMrgX1-Zellen endogen exprimiert wird (Francel, 1987a, Francel, 1987b), vergleichend untersucht (vgl. Abschnitt 5.4.2.4). Für den B2R ist bereits eine NFAT-Aktivierung in primären Spinalganglienneuronen beschrieben worden (Jackson, 2007), so dass dieser GPCR besonders gut zum geplanten Vergleich geeignet ist. Eine B2R-vermittelte Aktivierung NFAT-abhängiger Transkription konnte auch in dieser Arbeit bestätigt

werden, allerdings wurde zudem evident, dass weder auf mRNA- noch auf funktioneller Proteinexpressionsebene eine CCR2-Induktion durch den B2R vermittelt wird. Da die Aktivierung des NFAT-abhängigen Reporters, Ca^{2+} -Signale und die NFAT-abhängige IP3R-1-Induktion zwischen B2R und hMrgX1-Rezeptor in Bezug auf die erzielte Signalstärke übereinstimmen, können quantitative Unterschiede in der Rezeptor-induzierten Signaltransduktion als Erklärung für den beobachteten Unterschied ausgeschlossen werden. Es könnte allerdings postuliert werden, dass die Resistenz des hMrgX1-Rezeptors gegenüber der Agonisten-induzierten Desensibilisierung und Endozytose, die im Rahmen dieser Arbeit etabliert werden konnte, nötig ist, um über die gewählte Stimulationszeit (6 Stunden für die CCR2-mRNA, 20 Stunden für das CCR2-Protein) zu einer andauernden NFAT-Aktivierung beizutragen. Interessanterweise ist für den B2R beschrieben worden, dass dieser Rezeptor durch andauernde Ligandenstimulation desensibilisiert und endozytiert wird (Lamb, 2001), so dass das distinkte Endozytoseverhalten beider Rezeptoren die unterschiedliche CCR2-Induktion möglicherweise erklären könnte. Weitere Studien sollten zukünftig dieser interessanten Theorie nachgehen.

Ebenso könnte aus der distinkten CCR2-Induktion abgeleitet werden, dass die B2R-induzierte NFAT-Aktivierung nicht ausreichend ist, um zu einer CCR2-Induktion zu führen. Vielmehr besteht die Möglichkeit, dass die Stimulation des hMrgX1-Rezeptors essentielle Ko-Faktoren aktiviert, die in Kombination mit NFAT die CCR2-Transkription steigern. Diese Theorie wird durch die Beobachtung unterstützt, dass NFAT-Proteine häufig mit anderen Transkriptionsfaktoren Heterodimere bilden und nur in dieser Form zur Transkriptionsinitiation beitragen (Ali, 2000, Decker, 2003, Lohoff, 2010). Dabei sind in der Tat häufig die Erk-1/2-abhängig aktivierten Proteine EGR-1 und AP-1 (Dimer aus c-Fos und c-Jun) als Heterodimerisierungspartner gefunden worden (Ali, 2000, Decker, 2003, Lohoff, 2010), welche im Rahmen dieser Arbeit bereits als Zielgene der hMrgX1-abhängigen Genregulation beschrieben wurden. Da der B2R in F11-hMrgX1-Zellen allerdings ebenso zur Induktion von EGR-1 auf mRNA- und Proteinebene sowie zur Induktion von c-Fos auf mRNA-Ebene befähigt ist, müssten andere Transkriptionsfaktoren an der hMrgX1-vermittelten CCR2-Induktion beteiligt sein.

In zukünftigen Studien sollte daher geklärt werden, ob Transkriptionsfaktoren, deren Aktivierung mit einer CCR2-Induktion in anderen Geweben korreliert werden konnte, durch hMrgX1-Rezeptoren oder B2R in F11-hMrgX1-Zellen distinkt reguliert werden. Mechanistisch könnte eine hMrgX1-selektive Aktivierung eines CCR2-Ko-Aktivators, die hMrgX1-selektive Inhibition eines konstitutiven CCR2-Repressors, die B2R-selektive Aktivierung eines CCR2-Repressors oder eine Kombination dieser Mechanismen angenommen werden. Einen potentiellen Ko-Aktivator stellt die *CCAAT/enhancer-binding protein* (C/EBP)-Familie dar, die zum einen in der Lage ist,

Gewebe-spezifisch die Transkription distinkter Gene zu stimulieren (Wedel, 1995), und zum anderen an der CCR2-Induktion in verschiedenen myeloiden Zelllinien beteiligt sein soll (Iida, 2008, Yamamoto, 1999). In diesem Zusammenhang wurde auch eine Beteiligung des MAPK-Signaltransduktionsweges impliziert (Iida, 2008), was gut zur hier beobachteten Aktivierung der Erk-1/2 durch den hMrgX1-Rezeptor passen würde. Der *peroxisome proliferator-activated receptor* γ (PPAR γ) wurde als konstitutiv-aktiver Repressor des CCR2 in humanen und murinen Monozyten beschrieben, dessen Aktivität durch erhöhte Mengen an Cholesterin inhibiert werden kann (Chen, 2005, Han, 2005). Allerdings wurde auch ermittelt, dass verschiedene Wachstumsfaktoren an der PPAR γ -Inhibition beteiligt sein können, wobei diese Inhibition über Erk-1/2 vermittelte wird (Camp, 1997). Da der PPAR γ -Antagonist Pioglitazon außerdem die Entwicklung neuropathischer Schmerzen in Mäusen reduzierte (Maeda, 2008), könnte eine Erk-1/2-abhängige hMrgX1-vermittelte PPAR γ -Inhibition an der beobachteten CCR2-Induktion beteiligt sein. Schließlich gibt es Hinweise auf eine Beteiligung von STAT-Proteinen an der Interferon- γ -vermittelten transkriptionellen Repression von CCR2 in einer humanen myeloiden Zelllinie (Phillips, 2005), so dass eine B2R-selektive STAT-Aktivierung als Begründung für die fehlende CCR2-Induktion durch Bradykinin postuliert werden könnte. In zukünftigen Studien sollte also in F11-hMrgX1-Zellen analysiert werden, ob die Aktivität von C/EBP- und STAT-Proteinen durch B2R bzw. hMrgX1-Rezeptoren selektiv aktiviert bzw. die Aktivität von PPAR γ selektiv inhibiert wird, um eine molekulare Begründung für die hMrgX1-selektive CCR2-Induktion zu liefern.

6.5.3 hMrgX1-vermittelte parakrine Interaktion von Nozizeptoren und Mastzellen

Neben der Induktion des CCR2 in nozizeptiven Spinalganglienneuronen ist die erhöhte Expression des CCR2-Liganden CCL2 ebenso als wichtige Determinante der Schmerzchronifizierung identifiziert worden (Bhangoo, 2007, Jung, 2009, Tanaka, 2004, White, 2005). Dabei sollen die nozizeptiven Spinalganglienneurone, residente Mastzellen oder einwandernde Makrophagen für die CCL2-Produktion verantwortlich sein. Im Rahmen dieser Arbeit wurde überprüft, ob der hMrgX1-Rezeptor neben der CCR2-Induktion ebenso die Produktion von CCL2 steigern kann. Entsprechend seiner Expression wurde zunächst überprüft, ob CCL2 in F11-hMrgX1-Zellen nach einer Stimulation mit BAM8-22 induziert wird, dies war allerdings nicht der Fall (vgl. Abbildung 5.83).

Transkripte des hMrgX1-Rezeptors wurden kürzlich in Mastzellen detektiert (Subramanian, 2011b, Tatemoto, 2006), allerdings ist diese Expression bislang auf Proteinebene nicht bestätigt worden. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in der humanen Mastzelllinie LAD2 erstmals die endogene hMrgX1-Proteinexpression auf funktioneller

Ebene verifiziert, indem Ca^{2+} -Signale mit dem hMrgX1-spezifischen Agonisten BAM8-22 ausgelöst wurden (vgl. Abbildung 5.82). Mit LAD2-Zellen stand somit ein nicht-neuronales Zellmodell zur Verfügung, in dem sodann die Produktion von CCL2 nach Stimulation mit BAM8-22 getestet wurde, da gut etabliert ist, dass Mastzellen verschiedene Mediatoren, u. a. CCL2, ausschütten können (Galli, 2011, Kulka, 2008). Interessanterweise fand sich eine BAM8-22-induzierte Steigerung der CCL2-Produktion in LAD2-Zellen (vgl. Abbildung 5.84), so dass der hMrgX1-Rezeptor in nozizeptiven Spinalganglienneuronen den CCR2 induzieren und in Mastzellen die CCL2-Produktion steigern kann. Da Mastzellen bereits eine wichtige Rolle bei der Entwicklung neuropathischer Schmerzen zugeordnet werden konnte (Zuo, 2003) und da sie häufig sehr eng mit peripheren Nerven assoziiert sind (Galli, 2011), könnte somit eine neue BAM8-22-stimulierte Signalschleife entstehen, die eine parakrine CCL2-Stimulation nozizeptiver, CCR2-positiver Spinalganglienneurone durch Mastzellen im Zuge der neuropathischen Schmerzchronifizierung vermittelt. Aufgrund der selektiven Expression in Mastzellen und Nozizeptoren würde eine Blockade von hMrgX1-Rezeptoren daher eine potentiell nebenwirkungsarme Möglichkeit bieten, die Etablierung der pro-algetisch wirkenden CCR2/CCL2-Signaltransduktion zu inhibieren.

In zukünftigen Studien wird es interessant sein, die funktionalen Konsequenzen der hMrgX1-Rezeptorexpression in Mastzellen unabhängig von einer Steigerung der CCL2-Produktion zu untersuchen. Möglicherweise könnten hMrgX1-Rezeptoren die Produktion und Freisetzung anderer Mediatoren aus Mastzellen modulieren. In diesem Kontext könnten möglicherweise auch die beschriebenen pruritogenen Empfindungen nach BAM8-22-Applikation im Menschen (Sikand, 2011) erklärt werden.

Zusammenfassend wurden damit im Rahmen dieser Dissertation Zielstrukturen des hMrgX1-Rezeptors identifiziert, die an der akuten Nozizeption sowie der peripheren Schmerzchronifizierung beteiligt sind. Das molekulare Verständnis dieser Signalwege kann zukünftig bei der Entwicklung neuer analgetischer Wirkstoffe genutzt werden.

7 Literaturverzeichnis

- ABBADIE, C., LINDIA, J. A., CUMISKEY, A. M., PETERSON, L. B., MUDGETT, J. S., et al. 2003. Impaired neuropathic pain responses in mice lacking the chemokine receptor CCR2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 7947-52.
- ABOULAICH, N., VAINONEN, J. P., STRALFORS, P. & VENER, A. V. 2004. Vectorial proteomics reveal targeting, phosphorylation and specific fragmentation of polymerase I and transcript release factor (PTRF) at the surface of caveolae in human adipocytes. *Biochem J*, 383, 237-48.
- AHN, S., SHENOY, S. K., WEI, H. & LEFKOWITZ, R. J. 2004. Differential kinetic and spatial patterns of beta-arrestin and G protein-mediated ERK activation by the angiotensin II receptor. *J Biol Chem*, 279, 35518-25.
- AJIT, S. K., PAUSCH, M. H., KENNEDY, J. D. & KAFTAN, E. J. 2010. Development of a FLIPR assay for the simultaneous identification of MrgD agonists and antagonists from a single screen. *J Biomed Biotechnol*, 2010.
- ALAM, J. & COOK, J. L. 1990. Reporter genes: application to the study of mammalian gene transcription. *Anal Biochem*, 188, 245-54.
- ALEY, K. O. & LEVINE, J. D. 1999. Role of protein kinase A in the maintenance of inflammatory pain. *J Neurosci*, 19, 2181-6.
- ALEY, K. O., MARTIN, A., MCMAHON, T., MOK, J., LEVINE, J. D., et al. 2001. Nociceptor sensitization by extracellular signal-regulated kinases. *J Neurosci*, 21, 6933-9.
- ALI, H., AHAMED, J., HERNANDEZ-MUNAIN, C., BARON, J. L., KRANGEL, M. S., et al. 2000. Chemokine production by G protein-coupled receptor activation in a human mast cell line: roles of extracellular signal-regulated kinase and NFAT. *J Immunol*, 165, 7215-23.
- ALVAREZ, V., ARTTAMANGKUL, S. & WILLIAMS, J. T. 2001. A RAVE about opioid withdrawal. *Neuron*, 32, 761-3.
- AMIR, R., KOCSIS, J. D. & DEVOR, M. 2005. Multiple interacting sites of ectopic spike electrogenesis in primary sensory neurons. *J Neurosci*, 25, 2576-85.
- ARIENS, E. J. 1966. A molecular basis for the action of drugs. I. Receptor-theory and structure-effect relations. *Arzneimittelforschung*, 16, 1376-95.
- ASHIDA, N., ARAI, H., YAMASAKI, M. & KITA, T. 2001. Distinct signaling pathways for MCP-1-dependent integrin activation and chemotaxis. *J Biol Chem*, 276, 16555-60.
- AVIDOR-REISS, T., NEVO, I., LEVY, R., PFEUFFER, T. & VOGEL, Z. 1996. Chronic opioid treatment induces adenylyl cyclase V superactivation. Involvement of Gbetagamma. *J Biol Chem*, 271, 21309-15.
- AZZI, M., CHAREST, P. G., ANGERS, S., ROUSSEAU, G., KOHOUT, T., et al. 2003. Beta-arrestin-mediated activation of MAPK by inverse agonists reveals distinct active conformations for G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 11406-11.
- BAGHESTANIAN, M., HOFBAUER, R., KIENER, H. P., BANKL, H. C., WIMAZAL, F., et al. 1997. The c-kit ligand stem cell factor and anti-IgE promote expression of monocyte chemoattractant protein-1 in human lung mast cells. *Blood*, 90, 4438-49.
- BAR-NUN, S., SHNEYOUR, Y. & BECKMANN, J. S. 1983. G-418, an elongation inhibitor of 80 S ribosomes. *Biochim Biophys Acta*, 741, 123-7.
- BAUBET, V., LE MOUËLLIC, H., CAMPBELL, A. K., LUCAS-MEUNIER, E., FOSSIER, P., et al. 2000. Chimeric green fluorescent protein-aequorin as bioluminescent Ca²⁺ reporters at the single-cell level. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 7260-5.

- BECK, E., LUDWIG, G., AUERSWALD, E. A., REISS, B. & SCHALLER, H. 1982. Nucleotide sequence and exact localization of the neomycin phosphotransferase gene from transposon Tn5. *Gene*, 19, 327-36.
- BENOVIC, J. L., KUHN, H., WEYAND, I., CODINA, J., CARON, M. G., et al. 1987. Functional desensitization of the isolated beta-adrenergic receptor by the beta-adrenergic receptor kinase: potential role of an analog of the retinal protein arrestin (48-kDa protein). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 8879-82.
- BERGER, A. C. & WHISTLER, J. L. 2010. How to design an opioid drug that causes reduced tolerance and dependence. *Ann Neurol*, 67, 559-69.
- BERGMAN, R. N. & HECHTER, O. 1978. Neurohypophyseal hormone-responsive renal adenylate cyclase. IV. A random-hit matrix model for coupling in a hormone-sensitive adenylate cyclase system. *J Biol Chem*, 253, 3238-50.
- BERMAN, D. M., KOZASA, T. & GILMAN, A. G. 1996. The GTPase-activating protein RGS4 stabilizes the transition state for nucleotide hydrolysis. *J Biol Chem*, 271, 27209-12.
- BHANGOO, S., REN, D., MILLER, R. J., HENRY, K. J., LINESWALA, J., et al. 2007. Delayed functional expression of neuronal chemokine receptors following focal nerve demyelination in the rat: a mechanism for the development of chronic sensitization of peripheral nociceptors. *Mol Pain*, 3, 38.
- BHANGOO, S. K., RIPSCH, M. S., BUCHANAN, D. J., MILLER, R. J. & WHITE, F. A. 2009. Increased chemokine signaling in a model of HIV1-associated peripheral neuropathy. *Mol Pain*, 5, 48.
- BHAVE, G., HU, H. J., GLAUNER, K. S., ZHU, W., WANG, H., et al. 2003. Protein kinase C phosphorylation sensitizes but does not activate the capsaicin receptor transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1). *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 12480-5.
- BHAVE, G., ZHU, W., WANG, H., BRASIER, D. J., OXFORD, G. S., et al. 2002. cAMP-dependent protein kinase regulates desensitization of the capsaicin receptor (VR1) by direct phosphorylation. *Neuron*, 35, 721-31.
- BINSHTOK, A. M., WANG, H., ZIMMERMANN, K., AMAYA, F., VARDEH, D., et al. 2008. Nociceptors are interleukin-1beta sensors. *J Neurosci*, 28, 14062-73.
- BIRKLEIN, F. & SCHMELZ, M. 2008. Neuropeptides, neurogenic inflammation and complex regional pain syndrome (CRPS). *Neurosci Lett*, 437, 199-202.
- BIT, R. A., DAVIS, P. D., ELLIOTT, L. H., HARRIS, W., HILL, C. H., et al. 1993. Inhibitors of Protein-Kinase-C .3. Potent and Highly Selective Bisindolylmaleimides by Conformational Restriction. *J Med Chem*, 36, 21-29.
- BLAUKAT, A., PIZARD, A., BREIT, A., WERNSTEDT, C., ALHENC-GELAS, F., et al. 2001. Determination of bradykinin B2 receptor in vivo phosphorylation sites and their role in receptor function. *J Biol Chem*, 276, 40431-40.
- BOCKAERT, J. & PIN, J. P. 1999. Molecular tinkering of G protein-coupled receptors: an evolutionary success. *EMBO J*, 18, 1723-9.
- BOEKHOFF, I., INGLESE, J., SCHLEICHER, S., KOCH, W. J., LEFKOWITZ, R. J., et al. 1994. Olfactory desensitization requires membrane targeting of receptor kinase mediated by beta gamma-subunits of heterotrimeric G proteins. *J Biol Chem*, 269, 37-40.
- BOKOCH, G. M., KATADA, T., NORTHUP, J. K., HEWLETT, E. L. & GILMAN, A. G. 1983. Identification of the predominant substrate for ADP-ribosylation by islet activating protein. *J Biol Chem*, 258, 2072-5.
- BOKOCH, G. M., KATADA, T., NORTHUP, J. K., UI, M. & GILMAN, A. G. 1984. Purification and properties of the inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. *J Biol Chem*, 259, 3560-7.
- BOLAND, L. M., ALLEN, A. C. & DINGLELINE, R. 1991. Inhibition by bradykinin of voltage-activated barium current in a rat dorsal root ganglion cell line: role of protein kinase C. *J Neurosci*, 11, 1140-9.

- BREIT, A., GAGNIDZE, K., DEVI, L. A., LAGACE, M. & BOUVIER, M. 2006a. Simultaneous activation of the delta opioid receptor (deltaOR)/sensory neuron-specific receptor-4 (SNSR-4) hetero-oligomer by the mixed bivalent agonist bovine adrenal medulla peptide 22 activates SNSR-4 but inhibits deltaOR signaling. *Mol Pharmacol*, 70, 686-96.
- BREIT, A., WOLFF, K., KALWA, H., JARRY, H., BUCH, T., et al. 2006b. The natural inverse agonist agouti-related protein induces arrestin-mediated endocytosis of melanocortin-3 and -4 receptors. *J Biol Chem*, 281, 37447-56.
- BREITWIESER, G. E. & SZABO, G. 1985. Uncoupling of cardiac muscarinic and beta-adrenergic receptors from ion channels by a guanine nucleotide analogue. *Nature*, 317, 538-40.
- BUCHWALTER, G., GROSS, C. & WASYLYK, B. 2004. Ets ternary complex transcription factors. *Gene*, 324, 1-14.
- BUHL, A. M., JOHNSON, N. L., DHANASEKARAN, N. & JOHNSON, G. L. 1995. G alpha 12 and G alpha 13 stimulate Rho-dependent stress fiber formation and focal adhesion assembly. *J Biol Chem*, 270, 24631-4.
- BULLITT, E. 1989. Induction of c-fos-like protein within the lumbar spinal cord and thalamus of the rat following peripheral stimulation. *Brain Res*, 493, 391-7.
- BUNEMANN, M., FRANK, M. & LOHSE, M. J. 2003. Gi protein activation in intact cells involves subunit rearrangement rather than dissociation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 16077-82.
- BURD, P. R., ROGERS, H. W., GORDON, J. R., MARTIN, C. A., JAYARAMAN, S., et al. 1989. Interleukin 3-dependent and -independent mast cells stimulated with IgE and antigen express multiple cytokines. *J Exp Med*, 170, 245-57.
- BURSTEIN, E. S., OTT, T. R., FEDDOCK, M., MA, J. N., FUHS, S., et al. 2006. Characterization of the Mas-related gene family: structural and functional conservation of human and rhesus MrgX receptors. *Br J Pharmacol*, 147, 73-82.
- CAI, M., CHEN, T., QUIRION, R. & HONG, Y. 2007a. The involvement of spinal bovine adrenal medulla 22-like peptide, the proenkephalin derivative, in modulation of nociceptive processing. *Eur J Neurosci*, 26, 1128-38.
- CAI, Q., JIANG, J., CHEN, T. & HONG, Y. 2007b. Sensory neuron-specific receptor agonist BAM8-22 inhibits the development and expression of tolerance to morphine in rats. *Behav Brain Res*, 178, 154-9.
- CAMP, H. S. & TAFURI, S. R. 1997. Regulation of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity by mitogen-activated protein kinase. *J Biol Chem*, 272, 10811-6.
- CAMPS, M., CAROZZI, A., SCHNABEL, P., SCHEER, A., PARKER, P. J., et al. 1992. Isozyme-selective stimulation of phospholipase C-beta 2 by G protein beta gamma-subunits. *Nature*, 360, 684-6.
- CASSEL, D. & SELINGER, Z. 1976. Catecholamine-stimulated GTPase activity in turkey erythrocyte membranes. *Biochim Biophys Acta*, 452, 538-51.
- CATERINA, M. J., SCHUMACHER, M. A., TOMINAGA, M., ROSEN, T. A., LEVINE, J. D., et al. 1997. The capsaicin receptor: a heat-activated ion channel in the pain pathway. *Nature*, 389, 816-24.
- CEN, B., SELVARAJ, A., BURGESS, R. C., HITZLER, J. K., MA, Z., et al. 2003. Megakaryoblastic leukemia 1, a potent transcriptional coactivator for serum response factor (SRF), is required for serum induction of SRF target genes. *Mol Cell Biol*, 23, 6597-608.
- CESARE, P., DEKKER, L. V., SARDINI, A., PARKER, P. J. & MCNAUGHTON, P. A. 1999. Specific involvement of PKC-epsilon in sensitization of the neuronal response to painful heat. *Neuron*, 23, 617-24.
- CESARE, P. & MCNAUGHTON, P. 1996. A novel heat-activated current in nociceptive neurons and its sensitization by bradykinin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 15435-9.

- CHANG, M., LI, W., PENG, Y. L., GAO, Y. H., YAO, J., et al. 2009. Involvement of NMDA receptor in nociceptive effects elicited by intrathecal [Tyr6] gamma2-MSH(6-12), and the interaction with nociceptin/orphanin FQ in pain modulation in mice. *Brain Res*, 1271, 36-48.
- CHEN, H. & IKEDA, S. R. 2004. Modulation of ion channels and synaptic transmission by a human sensory neuron-specific G-protein-coupled receptor, SNSR4/mrgX1, heterologously expressed in cultured rat neurons. *J Neurosci*, 24, 5044-53.
- CHEN, P., WANG, D., LI, M., ZHANG, Y., QUIRION, R., et al. 2010. Modulation of sensory neuron-specific receptors in the development of morphine tolerance and its neurochemical mechanisms. *J Neurosci Res*, 88, 2952-63.
- CHEN, T., CAI, Q. & HONG, Y. 2006. Intrathecal sensory neuron-specific receptor agonists bovine adrenal medulla 8-22 and (Tyr6)-gamma2-MSH-6-12 inhibit formalin-evoked nociception and neuronal Fos-like immunoreactivity in the spinal cord of the rat. *Neuroscience*, 141, 965-75.
- CHEN, T., HU, Z., QUIRION, R. & HONG, Y. 2008. Modulation of NMDA receptors by intrathecal administration of the sensory neuron-specific receptor agonist BAM8-22. *Neuropharmacology*, 54, 796-803.
- CHEN, T., JIANG, J., HUANG, H., WANG, D., LIU, Y., et al. 2012. Role of bovine adrenal medulla 22 (BAM22) in the pathogenesis of neuropathic pain in rats with spinal nerve ligation. *Eur J Pharmacol*, 685, 24-9.
- CHEN, Y., GREEN, S. R., HO, J., LI, A., ALMAZAN, F., et al. 2005. The mouse CCR2 gene is regulated by two promoters that are responsive to plasma cholesterol and peroxisome proliferator-activated receptor gamma ligands. *Biochem Biophys Res Commun*, 332, 188-93.
- CHEUNG, Y. F., O, K., TAM, S. C. & SIOW, Y. L. 2005. Induction of MCP1, CCR2, and iNOS expression in THP-1 macrophages by serum of children late after Kawasaki disease. *Pediatr Res*, 58, 1306-10.
- CHIENG, B. & WILLIAMS, J. T. 1998. Increased opioid inhibition of GABA release in nucleus accumbens during morphine withdrawal. *J Neurosci*, 18, 7033-9.
- CHIN, D. & MEANS, A. R. 2000. Calmodulin: a prototypical calcium sensor. *Trends Cell Biol*, 10, 322-8.
- CHOI, S. S. & LAHN, B. T. 2003. Adaptive evolution of MRG, a neuron-specific gene family implicated in nociception. *Genome Res*, 13, 2252-9.
- CHU, P., MURRAY, S., LISSIN, D. & VON ZASTROW, M. 1997. Delta and kappa opioid receptors are differentially regulated by dynamin-dependent endocytosis when activated by the same alkaloid agonist. *J Biol Chem*, 272, 27124-30.
- CHU, X., ZHANG, Z., YABUT, J., HORWITZ, S., LEVORSE, J., et al. 2012. Characterization of multidrug resistance 1a/P-glycoprotein knockout rats generated by zinc finger nucleases. *Mol Pharmacol*, 81, 220-7.
- CHUANG, H. H., PRESCOTT, E. D., KONG, H., SHIELDS, S., JORDT, S. E., et al. 2001. Bradykinin and nerve growth factor release the capsaicin receptor from PtdIns(4,5)P2-mediated inhibition. *Nature*, 411, 957-62.
- CLAING, A., LAPORTE, S. A., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. Endocytosis of G protein-coupled receptors: roles of G protein-coupled receptor kinases and beta-arrestin proteins. *Prog Neurobiol*, 66, 61-79.
- COMBADIÈRE, C., AHUJA, S. K., VAN DAMME, J., TIFFANY, H. L., GAO, J. L., et al. 1995. Monocyte chemoattractant protein-3 is a functional ligand for CC chemokine receptors 1 and 2B. *J Biol Chem*, 270, 29671-5.
- COSTIGAN, M., SCHOLZ, J. & WOOLF, C. J. 2009. Neuropathic pain: a maladaptive response of the nervous system to damage. *Annu Rev Neurosci*, 32, 1-32.
- COWARD, P., WADA, H. G., FALK, M. S., CHAN, S. D., MENG, F., et al. 1998. Controlling signaling with a specifically designed Gi-coupled receptor. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 352-7.

- CROZIER, R. A., AJIT, S. K., KAFTAN, E. J. & PAUSCH, M. H. 2007. MrgD activation inhibits KCNQ/M-currents and contributes to enhanced neuronal excitability. *J Neurosci*, 27, 4492-6.
- CSABA, Z. & DOURNAUD, P. 2001. Cellular biology of somatostatin receptors. *Neuropeptides*, 35, 1-23.
- CUBITT, A. B., HEIM, R., ADAMS, S. R., BOYD, A. E., GROSS, L. A., et al. 1995. Understanding, improving and using green fluorescent proteins. *Trends Biochem Sci*, 20, 448-55.
- DAI, Y., MORIYAMA, T., HIGASHI, T., TOGASHI, K., KOBAYASHI, K., et al. 2004. Proteinase-activated receptor 2-mediated potentiation of transient receptor potential vanilloid subfamily 1 activity reveals a mechanism for proteinase-induced inflammatory pain. *J Neurosci*, 24, 4293-9.
- DAVIES, J. & JIMENEZ, A. 1980. A new selective agent for eukaryotic cloning vectors. *Am J Trop Med Hyg*, 29, 1089-92.
- DE LEAN, A., STADEL, J. M. & LEFKOWITZ, R. J. 1980. A ternary complex model explains the agonist-specific binding properties of the adenylate cyclase-coupled beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 255, 7108-17.
- DECKER, E. L., NEHMANN, N., KAMPEN, E., EIBEL, H., ZIPFEL, P. F., et al. 2003. Early growth response proteins (EGR) and nuclear factors of activated T cells (NFAT) form heterodimers and regulate proinflammatory cytokine gene expression. *Nucleic Acids Res*, 31, 911-21.
- DEWIRE, S. M., AHN, S., LEFKOWITZ, R. J. & SHENOY, S. K. 2007. Beta-arrestins and cell signaling. *Annu Rev Physiol*, 69, 483-510.
- DHANASEKARAN, N. & DERMOTT, J. M. 1996. Signaling by the G12 class of G proteins. *Cell Signal*, 8, 235-45.
- DIXON, R. A., KOBILKA, B. K., STRADER, D. J., BENOVIĆ, J. L., DOHLMAN, H. G., et al. 1986. Cloning of the gene and cDNA for mammalian beta-adrenergic receptor and homology with rhodopsin. *Nature*, 321, 75-9.
- DONG, X., HAN, S., ZYLKA, M. J., SIMON, M. I. & ANDERSON, D. J. 2001. A diverse family of GPCRs expressed in specific subsets of nociceptive sensory neurons. *Cell*, 106, 619-32.
- DROCOURT, D., CALMELS, T., REYNES, J. P., BARON, M. & TIRABY, G. 1990. Cassettes of the Streptoalloteichus hindustanus ble gene for transformation of lower and higher eukaryotes to phleomycin resistance. *Nucleic Acids Res*, 18, 4009.
- DUMUIS, A., BOUHELAL, R., SEBBEN, M., CORY, R. & BOCKAERT, J. 1988. A nonclassical 5-hydroxytryptamine receptor positively coupled with adenylate cyclase in the central nervous system. *Mol Pharmacol*, 34, 880-7.
- DWORKIN, R. H., BACKONJA, M., ROWBOTHAM, M. C., ALLEN, R. R., ARGOFF, C. R., et al. 2003. Advances in neuropathic pain: diagnosis, mechanisms, and treatment recommendations. *Arch Neurol*, 60, 1524-34.
- DWORKIN, R. H., O'CONNOR, A. B., AUDETTE, J., BARON, R., GOURLAY, G. K., et al. 2010. Recommendations for the pharmacological management of neuropathic pain: an overview and literature update. *Mayo Clin Proc*, 85, S3-14.
- EIJKELKAMP, N., HEIJNEN, C. J., WILLEMEN, H. L., DEUMENS, R., JOOSTEN, E. A., et al. 2010. GRK2: a novel cell-specific regulator of severity and duration of inflammatory pain. *J Neurosci*, 30, 2138-49.
- EKBERG, J. & ADAMS, D. J. 2006. Neuronal voltage-gated sodium channel subtypes: key roles in inflammatory and neuropathic pain. *Int J Biochem Cell Biol*, 38, 2005-10.
- ENGELMAN, D. M. 1982. An Implication of the Structure of Bacteriorhodopsin: Globular Membrane Proteins are Stabilized by Polar Interactions. *Biophys J*, 37, 187-8.
- ETKIN, A., ALARCON, J. M., WEISBERG, S. P., TOUZANI, K., HUANG, Y. Y., et al. 2006. A role in learning for SRF: deletion in the adult forebrain disrupts LTD and the formation of an immediate memory of a novel context. *Neuron*, 50, 127-43.

- FAN, S. F., SHEN, K. F. & CRAIN, S. M. 1993. mu and delta opioid agonists at low concentrations decrease voltage-dependent K⁺ currents in F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells via cholera toxin-sensitive receptors. *Brain Res*, 605, 214-20.
- FAN, S. F., SHEN, K. F., SCHEIDELER, M. A. & CRAIN, S. M. 1992. F11 neuroblastoma x DRG neuron hybrid cells express inhibitory mu- and delta-opioid receptors which increase voltage-dependent K⁺ currents upon activation. *Brain Res*, 590, 329-33.
- FATAKIA, S. N., COSTANZI, S. & CHOW, C. C. 2011. Molecular evolution of the transmembrane domains of G protein-coupled receptors. *PLoS One*, 6, e27813.
- FERGUSON, S. S. 2001. Evolving concepts in G protein-coupled receptor endocytosis: the role in receptor desensitization and signaling. *Pharmacol Rev*, 53, 1-24.
- FERGUSON, S. S. & CARON, M. G. 1998. G protein-coupled receptor adaptation mechanisms. *Semin Cell Dev Biol*, 9, 119-27.
- FERNANDEZ, L. M. & PUETT, D. 1996. Lys583 in the third extracellular loop of the lutropin/choriogonadotropin receptor is critical for signaling. *J Biol Chem*, 271, 925-30.
- FINN, A. K. & WHISTLER, J. L. 2001. Endocytosis of the mu opioid receptor reduces tolerance and a cellular hallmark of opiate withdrawal. *Neuron*, 32, 829-39.
- FIORAVANTI, B., DE FELICE, M., STUCKY, C. L., MEDLER, K. A., LUO, M. C., et al. 2008. Constitutive activity at the cannabinoid CB1 receptor is required for behavioral response to noxious chemical stimulation of TRPV1: antinociceptive actions of CB1 inverse agonists. *J Neurosci*, 28, 11593-602.
- FITZGERALD, E. M., OKUSE, K., WOOD, J. N., DOLPHIN, A. C. & MOSS, S. J. 1999. cAMP-dependent phosphorylation of the tetrodotoxin-resistant voltage-dependent sodium channel SNS. *J Physiol*, 516 (Pt 2), 433-46.
- FLORIO, V. A. & STERNWEIS, P. C. 1989. Mechanisms of muscarinic receptor action on Go in reconstituted phospholipid vesicles. *J Biol Chem*, 264, 3909-15.
- FOORD, S. M., BONNER, T. I., NEUBIG, R. R., ROSSER, E. M., PIN, J. P., et al. 2005. International Union of Pharmacology. XLVI. G protein-coupled receptor list. *Pharmacol Rev*, 57, 279-88.
- FRANCEL, P. C., HARRIS, K., SMITH, M., FISHMAN, M. C., DAWSON, G., et al. 1987a. Neurochemical characteristics of a novel dorsal root ganglion X neuroblastoma hybrid cell line, F-11. *J Neurochem*, 48, 1624-31.
- FRANCEL, P. C., MILLER, R. J. & DAWSON, G. 1987b. Modulation of bradykinin-induced inositol trisphosphate release in a novel neuroblastoma x dorsal root ganglion sensory neuron cell line (F-11). *J Neurochem*, 48, 1632-9.
- FRANK, M., THUMER, L., LOHSE, M. J. & BUNEMANN, M. 2005. G Protein activation without subunit dissociation depends on a G{alpha}(i)-specific region. *J Biol Chem*, 280, 24584-90.
- FRESHLY, I. R. 1994. Culture of Animal Cells: A Manual of basic technique.
- FU, E. S., ZHANG, Y. P., SAGEN, J., CANDIOTTI, K. A., MORTON, P. D., et al. 2010. Transgenic inhibition of glial NF-kappa B reduces pain behavior and inflammation after peripheral nerve injury. *Pain*, 148, 509-18.
- FUKUHARA, S., MURGA, C., ZOHAR, M., IGISHI, T. & GUTKIND, J. S. 1999. A novel PDZ domain containing guanine nucleotide exchange factor links heterotrimeric G proteins to Rho. *J Biol Chem*, 274, 5868-79.
- FUKUSUMI, S., KITADA, C., TAKEKAWA, S., KIZAWA, H., SAKAMOTO, J., et al. 1997. Identification and characterization of a novel human cortistatin-like peptide. *Biochem Biophys Res Commun*, 232, 157-63.
- GALES, C., REBOIS, R. V., HOGUE, M., TRIEU, P., BREIT, A., et al. 2005. Real-time monitoring of receptor and G-protein interactions in living cells. *Nat Methods*, 2, 177-84.
- GALLI, S. J., BORREGAARD, N. & WYNN, T. A. 2011. Phenotypic and functional plasticity of cells of innate immunity: macrophages, mast cells and neutrophils. *Nat Immunol*, 12, 1035-44.

- GARAMI, A., SHIMANSKY, Y. P., PAKAI, E., OLIVEIRA, D. L., GAVVA, N. R., et al. 2010. Contributions of different modes of TRPV1 activation to TRPV1 antagonist-induced hyperthermia. *J Neurosci*, 30, 1435-40.
- GATIGNOL, A., DURAND, H. & TIRABY, G. 1988. Bleomycin resistance conferred by a drug-binding protein. *FEBS Lett*, 230, 171-5.
- GAUDIOSO, C., HAO, J., MARTIN-EAUCLAIRE, M. F., GABRIAC, M. & DELMAS, P. 2012. Menthol pain relief through cumulative inactivation of voltage-gated sodium channels. *Pain*, 153, 473-84.
- GAVVA, N. R., BANNON, A. W., SURAPANENI, S., HOVLAND, D. N., JR., LEHTO, S. G., et al. 2007. The vanilloid receptor TRPV1 is tonically activated in vivo and involved in body temperature regulation. *J Neurosci*, 27, 3366-74.
- GAVVA, N. R., KLIONSKY, L., QU, Y., SHI, L., TAMIR, R., et al. 2004. Molecular determinants of vanilloid sensitivity in TRPV1. *J Biol Chem*, 279, 20283-95.
- GENAZZANI, A. A., CARAFOLI, E. & GUERINI, D. 1999. Calcineurin controls inositol 1,4,5-trisphosphate type 1 receptor expression in neurons. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 5797-801.
- GESTY-PALMER, D., FLANNERY, P., YUAN, L., CORSINO, L., SPURNEY, R., et al. 2009. A beta-arrestin-biased agonist of the parathyroid hormone receptor (PTH1R) promotes bone formation independent of G protein activation. *Sci Transl Med*, 1, 1ra1.
- GILMAN, A. G. 1987. G proteins: transducers of receptor-generated signals. *Annu Rev Biochem*, 56, 615-49.
- GOODMAN, O. B., JR., KRUPNICK, J. G., GUREVICH, V. V., BENOVIC, J. L. & KEEN, J. H. 1997. Arrestin/clathrin interaction. Localization of the arrestin binding locus to the clathrin terminal domain. *J Biol Chem*, 272, 15017-22.
- GOUMON, Y., LUGARDON, K., GADROY, P., STRUB, J. M., WELTERS, I. D., et al. 2000. Processing of proenkephalin-A in bovine chromaffin cells. Identification of natural derived fragments by N-terminal sequencing and matrix-assisted laser desorption ionization-time of flight mass spectrometry. *J Biol Chem*, 275, 38355-62.
- GRAEF, I. A., MERMELSTEIN, P. G., STANKUNAS, K., NEILSON, J. R., DEISSEROTH, K., et al. 1999. L-type calcium channels and GSK-3 regulate the activity of NF-ATc4 in hippocampal neurons. *Nature*, 401, 703-8.
- GRAHAM, F. L., SMILEY, J., RUSSELL, W. C. & NAIRN, R. 1977. Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, 36, 59-74.
- GRAZZINI, E., PUMA, C., ROY, M. O., YU, X. H., O'DONNELL, D., et al. 2004. Sensory neuron-specific receptor activation elicits central and peripheral nociceptive effects in rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 7175-80.
- GREENBERG, M. J. & PRICE, D. A. 1992. Relationships among the FMRFamide-like peptides. *Prog Brain Res*, 92, 25-37.
- GROTH, R. D., COICOU, L. G., MERMELSTEIN, P. G. & SEYBOLD, V. S. 2007. Neurotrophin activation of NFAT-dependent transcription contributes to the regulation of pro-nociceptive genes. *J Neurochem*, 102, 1162-74.
- GROTH, R. D. & MERMELSTEIN, P. G. 2003. Brain-derived neurotrophic factor activation of NFAT (nuclear factor of activated T-cells)-dependent transcription: a role for the transcription factor NFATc4 in neurotrophin-mediated gene expression. *J Neurosci*, 23, 8125-34.
- GRYNKIEWICZ, G., POENIE, M. & TSIEN, R. Y. 1985. A new generation of Ca²⁺ indicators with greatly improved fluorescence properties. *J Biol Chem*, 260, 3440-50.
- GUDERMANN, T., GROSSE, R. & SCHULTZ, G. 2000. Contribution of receptor/G protein signaling to cell growth and transformation. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 361, 345-62.
- GUDERMANN, T., MEDEROS Y SCHNITZLER, M. & DIETRICH, A. 2004. Receptor-operated cation entry--more than esoteric terminology? *Sci STKE*, 2004, pe35.

- GUHL, S., BABINA, M., NEOU, A., ZUBERBIER, T. & ARTUC, M. 2010. Mast cell lines HMC-1 and LAD2 in comparison with mature human skin mast cells--drastically reduced levels of tryptase and chymase in mast cell lines. *Exp Dermatol*, 19, 845-7.
- GUO, Q., SUBRAMANIAN, H., GUPTA, K. & ALI, H. 2011. Regulation of C3a receptor signaling in human mast cells by G protein coupled receptor kinases. *PLoS One*, 6, e22559.
- GUREVICH, E. V. & GUREVICH, V. V. 2006. Arrestins: ubiquitous regulators of cellular signaling pathways. *Genome Biol*, 7, 236.
- HAGA, K., HAGA, T. & ICHIYAMA, A. 1986. Reconstitution of the muscarinic acetylcholine receptor. Guanine nucleotide-sensitive high affinity binding of agonists to purified muscarinic receptors reconstituted with GTP-binding proteins (Gi and Go). *J Biol Chem*, 261, 10133-40.
- HAGER, U. A., HEIN, A., LENNERZ, J. K., ZIMMERMANN, K., NEUHUBER, W. L., et al. 2008. Morphological characterization of rat Mas-related G-protein-coupled receptor C and functional analysis of agonists. *Neuroscience*, 151, 242-54.
- HAINS, B. C., KLEIN, J. P., SAAB, C. Y., CRANER, M. J., BLACK, J. A., et al. 2003. Upregulation of sodium channel Nav1.3 and functional involvement in neuronal hyperexcitability associated with central neuropathic pain after spinal cord injury. *J Neurosci*, 23, 8881-92.
- HALL, R. A., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. 1999. Heptahelical receptor signaling: beyond the G protein paradigm. *J Cell Biol*, 145, 927-32.
- HAN, K. H., RYU, J., HONG, K. H., KO, J., PAK, Y. K., et al. 2005. HMG-CoA reductase inhibition reduces monocyte CC chemokine receptor 2 expression and monocyte chemoattractant protein-1-mediated monocyte recruitment in vivo. *Circulation*, 111, 1439-47.
- HAN, S. K., DONG, X., HWANG, J. I., ZYLKA, M. J., ANDERSON, D. J., et al. 2002. Orphan G protein-coupled receptors MrgA1 and MrgC11 are distinctively activated by RF-amide-related peptides through the Galpha q/11 pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 14740-5.
- HANAHAN, D. 1983. Studies on transformation of Escherichia coli with plasmids. *J Mol Biol*, 166, 557-80.
- HANDEL, E. M. & CATHOMEN, T. 2011. Zinc-finger nuclease based genome surgery: it's all about specificity. *Curr Gene Ther*, 11, 28-37.
- HANYALOGLU, A. C., VRECL, M., KROEGER, K. M., MILES, L. E., QIAN, H., et al. 2001. Casein kinase II sites in the intracellular C-terminal domain of the thyrotropin-releasing hormone receptor and chimeric gonadotropin-releasing hormone receptors contribute to beta-arrestin-dependent internalization. *J Biol Chem*, 276, 18066-74.
- HART, M. J., JIANG, X., KOZASA, T., ROSCOE, W., SINGER, W. D., et al. 1998. Direct stimulation of the guanine nucleotide exchange activity of p115 RhoGEF by Galpha13. *Science*, 280, 2112-4.
- HELLWIG, N., ALBRECHT, N., HARTENECK, C., SCHULTZ, G. & SCHAEFER, M. 2005. Homo- and heteromeric assembly of TRPV channel subunits. *J Cell Sci*, 118, 917-28.
- HENDRICH, J., VAN MINH, A. T., HEBLICH, F., NIETO-ROSTRO, M., WATSCHINGER, K., et al. 2008. Pharmacological disruption of calcium channel trafficking by the alpha2delta ligand gabapentin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 3628-33.
- HENSELLEK, S., BRELL, P., SCHAIBLE, H. G., BRAUER, R. & SEGOND VON BANCHET, G. 2007. The cytokine TNFalpha increases the proportion of DRG neurones expressing the TRPV1 receptor via the TNFR1 receptor and ERK activation. *Mol Cell Neurosci*, 36, 381-91.
- HEO, J., HAN, S. K., VAIDEHI, N., WENDEL, J., KEKENES-HUSKEY, P., et al. 2007. Prediction of the 3D structure of FMRF-amide neuropeptides bound to the mouse MrgC11 GPCR and experimental validation. *Chembiochem*, 8, 1527-39.

- HIMMLER, A., STRATOWA, C. & CZERNILOFSKY, A. P. 1993. Functional testing of human dopamine D1 and D5 receptors expressed in stable cAMP-responsive luciferase reporter cell lines. *J Recept Res*, 13, 79-94.
- HOFFMANN, C., ZIEGLER, N., REINER, S., KRASEL, C. & LOHSE, M. J. 2008. Agonist-selective, receptor-specific interaction of human P2Y receptors with beta-arrestin-1 and -2. *J Biol Chem*, 283, 30933-41.
- HOFMANN, T., OBUKHOV, A. G., SCHAEFER, M., HARTENECK, C., GUDERMANN, T., et al. 1999. Direct activation of human TRPC6 and TRPC3 channels by diacylglycerol. *Nature*, 397, 259-63.
- HOLLT, V., HAARMANN, I., GRIMM, C., HERZ, A., TULUNAY, F. C., et al. 1982. Pro-enkephalin intermediates in bovine brain and adrenal medulla: characterization of immunoreactive peptides related to BAM-22P and peptide F. *Life Sci*, 31, 1883-6.
- HONAN, S. A. & MCNAUGHTON, P. A. 2007. Sensitisation of TRPV1 in rat sensory neurones by activation of SNSRs. *Neurosci Lett*, 422, 1-6.
- HONG, Y., DAI, P., JIANG, J. & ZENG, X. 2004. Dual effects of intrathecal BAM22 on nociceptive responses in acute and persistent pain--potential function of a novel receptor. *Br J Pharmacol*, 141, 423-30.
- HOYT, S. B., LONDON, C., OK, H., GONZALEZ, E., DUFFY, J. L., et al. 2007. Benzazepinone Nav1.7 blockers: potential treatments for neuropathic pain. *Bioorg Med Chem Lett*, 17, 6172-7.
- HUANG, J., ZHANG, X. & MCNAUGHTON, P. A. 2006. Inflammatory pain: the cellular basis of heat hyperalgesia. *Curr Neuropharmacol*, 4, 197-206.
- HUCHO, T. & LEVINE, J. D. 2007. Signaling pathways in sensitization: toward a nociceptor cell biology. *Neuron*, 55, 365-76.
- HUCHO, T. B., DINA, O. A. & LEVINE, J. D. 2005. Epac mediates a cAMP-to-PKC signaling in inflammatory pain: an isolectin B4(+) neuron-specific mechanism. *J Neurosci*, 25, 6119-26.
- HUNSKAAR, S., FASMER, O. B. & HOLE, K. 1985. Formalin test in mice, a useful technique for evaluating mild analgesics. *J Neurosci Methods*, 14, 69-76.
- IIDA, S., WATANABE-FUKUNAGA, R., NAGATA, S. & FUKUNAGA, R. 2008. Essential role of C/EBPalpha in G-CSF-induced transcriptional activation and chromatin modification of myeloid-specific genes. *Genes Cells*, 13, 313-27.
- JACKSON, J. G., USACHEV, Y. M. & THAYER, S. A. 2007. Bradykinin-induced nuclear factor of activated T-cells-dependent transcription in rat dorsal root ganglion neurons. *Mol Pharmacol*, 72, 303-10.
- JACKSON, T. R., BLAIR, L. A., MARSHALL, J., GOEDERT, M. & HANLEY, M. R. 1988. The mas oncogene encodes an angiotensin receptor. *Nature*, 335, 437-40.
- JARA-OSGUERA, A., SIMON, S. A. & ROSENBAUM, T. 2008. TRPV1: on the road to pain relief. *Curr Mol Pharmacol*, 1, 255-69.
- JARVIS, M. F., HONORE, P., SHIEH, C. C., CHAPMAN, M., JOSHI, S., et al. 2007. A-803467, a potent and selective Nav1.8 sodium channel blocker, attenuates neuropathic and inflammatory pain in the rat. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 8520-5.
- JENSEN, F. C., GIRARDI, A. J., GILDEN, R. V. & KOPROWSKI, H. 1964. Infection of Human and Simian Tissue Cultures with Rous Sarcoma Virus. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 52, 53-9.
- JESKE, N. A., PATWARDHAN, A. M., RUPAREL, N. B., AKOPIAN, A. N., SHAPIRO, M. S., et al. 2009. A-kinase anchoring protein 150 controls protein kinase C-mediated phosphorylation and sensitization of TRPV1. *Pain*, 146, 301-7.
- JHON, D. Y., LEE, H. H., PARK, D., LEE, C. W., LEE, K. H., et al. 1993. Cloning, sequencing, purification, and Gq-dependent activation of phospholipase C-beta 3. *J Biol Chem*, 268, 6654-61.
- JJ, I. & JJ, T. H. 1995. Differential roles of exoloop 1 of the human follicle-stimulating hormone receptor in hormone binding and receptor activation. *J Biol Chem*, 270, 15970-3.

- JI, R. R., GEREAU, R. W. T., MALCANGIO, M. & STRICHARTZ, G. R. 2009. MAP kinase and pain. *Brain Res Rev*, 60, 135-48.
- JI, R. R., SAMAD, T. A., JIN, S. X., SCHMOLL, R. & WOOLF, C. J. 2002. p38 MAPK activation by NGF in primary sensory neurons after inflammation increases TRPV1 levels and maintains heat hyperalgesia. *Neuron*, 36, 57-68.
- JIANG, J., HUANG, J. & HONG, Y. 2006. Bovine adrenal medulla 22 reverses antinociceptive morphine tolerance in the rat. *Behav Brain Res*, 168, 167-71.
- JIN, X. & GEREAU, R. W. T. 2006. Acute p38-mediated modulation of tetrodotoxin-resistant sodium channels in mouse sensory neurons by tumor necrosis factor- α . *J Neurosci*, 26, 246-55.
- JONES, D. T. & REED, R. R. 1989. Golf: an olfactory neuron specific-G protein involved in odorant signal transduction. *Science*, 244, 790-5.
- JORDT, S. E. & JULIUS, D. 2002. Molecular basis for species-specific sensitivity to "hot" chili peppers. *Cell*, 108, 421-30.
- JOSHI, P., CHAKRABORTY, S., DEY, S., SHANKER, V., ANSARI, Z. A., et al. 2011. Binding of chloroquine-conjugated gold nanoparticles with bovine serum albumin. *J Colloid Interface Sci*, 355, 402-9.
- JOW, F., HE, L., KRAMER, A., HINSON, J., BOWLBY, M. R., et al. 2006. Validation of DRG-like F11 cells for evaluation of KCNQ/M-channel modulators. *Assay Drug Dev Technol*, 4, 49-56.
- JUNG, H., BHANGOO, S., BANISADR, G., FREITAG, C., REN, D., et al. 2009. Visualization of chemokine receptor activation in transgenic mice reveals peripheral activation of CCR2 receptors in states of neuropathic pain. *J Neurosci*, 29, 8051-62.
- JUNG, H. & MILLER, R. J. 2008a. Activation of the nuclear factor of activated T-cells (NFAT) mediates upregulation of CCR2 chemokine receptors in dorsal root ganglion (DRG) neurons: a possible mechanism for activity-dependent transcription in DRG neurons in association with neuropathic pain. *Mol Cell Neurosci*, 37, 170-7.
- JUNG, H., TOTH, P. T., WHITE, F. A. & MILLER, R. J. 2008b. Monocyte chemoattractant protein-1 functions as a neuromodulator in dorsal root ganglia neurons. *J Neurochem*, 104, 254-63.
- JUNG, J., SHIN, J. S., LEE, S. Y., HWANG, S. W., KOO, J., et al. 2004. Phosphorylation of vanilloid receptor 1 by Ca^{2+} /calmodulin-dependent kinase II regulates its vanilloid binding. *J Biol Chem*, 279, 7048-54.
- KAHN, R. A. & GILMAN, A. G. 1984a. ADP-ribosylation of Gs promotes the dissociation of its alpha and beta subunits. *J Biol Chem*, 259, 6235-40.
- KAHN, R. A. & GILMAN, A. G. 1984b. Purification of a protein cofactor required for ADP-ribosylation of the stimulatory regulatory component of adenylate cyclase by cholera toxin. *J Biol Chem*, 259, 6228-34.
- KAMOHARA, M., MATSUO, A., TAKASAKI, J., KOHDA, M., MATSUMOTO, M., et al. 2005. Identification of MrgX2 as a human G-protein-coupled receptor for proadrenomedullin N-terminal peptides. *Biochem Biophys Res Commun*, 330, 1146-52.
- KASHEM, S. W., SUBRAMANIAN, H., COLLINGTON, S. J., MAGOTTI, P., LAMBRIS, J. D., et al. 2011. G protein coupled receptor specificity for C3a and compound 48/80-induced degranulation in human mast cells: roles of Mas-related genes MrgX1 and MrgX2. *Eur J Pharmacol*, 668, 299-304.
- KATADA, T., BOKOCH, G. M., NORTHUP, J. K., UI, M. & GILMAN, A. G. 1984a. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Properties and function of the purified protein. *J Biol Chem*, 259, 3568-77.
- KATADA, T., BOKOCH, G. M., SMIGEL, M. D., UI, M. & GILMAN, A. G. 1984b. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and the inhibition of adenylate cyclase in S49 lymphoma cyc- and wild type membranes. *J Biol Chem*, 259, 3586-95.

- KATADA, T., NORTHUP, J. K., BOKOCH, G. M., UI, M. & GILMAN, A. G. 1984c. The inhibitory guanine nucleotide-binding regulatory component of adenylate cyclase. Subunit dissociation and guanine nucleotide-dependent hormonal inhibition. *J Biol Chem*, 259, 3578-85.
- KATAYAMA, N., IWATA, E., SAKURAI, H., TSUCHIYA, T. & TSUDA, M. 1993. Additive induction of Egr-1 (zif/268) mRNA expression in neuroblastoma x glioma hybrid NG108-15 cells via cholinergic muscarinic, alpha 2-adrenergic, and bradykinin receptors. *J Neurochem*, 60, 902-7.
- KEITH, D. E., MURRAY, S. R., ZAKI, P. A., CHU, P. C., LISSIN, D. V., et al. 1996. Morphine activates opioid receptors without causing their rapid internalization. *J Biol Chem*, 271, 19021-4.
- KENAKIN, T. 1995. Agonist-receptor efficacy. II. Agonist trafficking of receptor signals. *Trends Pharmacol Sci*, 16, 232-8.
- KENAKIN, T. 2011. Functional selectivity and biased receptor signaling. *J Pharmacol Exp Ther*, 336, 296-302.
- KENAKIN, T. & MILLER, L. J. 2010. Seven transmembrane receptors as shapeshifting proteins: the impact of allosteric modulation and functional selectivity on new drug discovery. *Pharmacol Rev*, 62, 265-304.
- KENDALL, G., ENSOR, E., BRAR-RAI, A., WINTER, J. & LATCHMAN, D. S. 1994. Nerve growth factor induces expression of immediate-early genes NGFI-A (Egr-1) and NGFI-B (nur 77) in adult rat dorsal root ganglion neurons. *Brain Res Mol Brain Res*, 25, 73-9.
- KENT, R. S., DE LEAN, A. & LEFKOWITZ, R. J. 1980. A quantitative analysis of beta-adrenergic receptor interactions: resolution of high and low affinity states of the receptor by computer modeling of ligand binding data. *Mol Pharmacol*, 17, 14-23.
- KIM, J. A., BARTLETT, S., HE, L., NIELSEN, C. K., CHANG, A. M., et al. 2008. Morphine-induced receptor endocytosis in a novel knockin mouse reduces tolerance and dependence. *Curr Biol*, 18, 129-35.
- KIM, M. S. & USACHEV, Y. M. 2009a. Mitochondrial Ca²⁺ cycling facilitates activation of the transcription factor NFAT in sensory neurons. *J Neurosci*, 29, 12101-14.
- KIM, Y. H., PARK, C. K., BACK, S. K., LEE, C. J., HWANG, S. J., et al. 2009b. Membrane-delimited coupling of TRPV1 and mGluR5 on presynaptic terminals of nociceptive neurons. *J Neurosci*, 29, 10000-9.
- KIRSHENBAUM, A. S., AKIN, C., WU, Y., ROTTEM, M., GOFF, J. P., et al. 2003. Characterization of novel stem cell factor responsive human mast cell lines LAD 1 and 2 established from a patient with mast cell sarcoma/leukemia; activation following aggregation of FcepsilonRI or FcgammaRI. *Leuk Res*, 27, 677-82.
- KITAGAWA, Y., MIYAI, A., USUI, K., HAMADA, Y., DEAI, K., et al. 2012. Pharmacological characterization of (3S)-3-(hydroxymethyl)-4-(5-methylpyridin-2-yl)-N-[6-(2,2,2-trifluoroethoxy)pyridin-3-yl]-3,4-dihydro-2H-benzo[b][1,4]oxazine-8-carboxamide (JTS-653), a novel transient receptor potential vanilloid 1 antagonist. *J Pharmacol Exp Ther*, 342, 520-8.
- KLEIBEUKER, W., LEDEBOER, A., EIJKELKAMP, N., WATKINS, L. R., MAIER, S. F., et al. 2007. A role for G protein-coupled receptor kinase 2 in mechanical allodynia. *Eur J Neurosci*, 25, 1696-704.
- KNOLL, B., KRETZ, O., FIEDLER, C., ALBERTI, S., SCHUTZ, G., et al. 2006. Serum response factor controls neuronal circuit assembly in the hippocampus. *Nat Neurosci*, 9, 195-204.
- KNOLL, B. & NORDHEIM, A. 2009. Functional versatility of transcription factors in the nervous system: the SRF paradigm. *Trends Neurosci*, 32, 432-42.
- KO, S. W., VADAKKAN, K. I., AO, H., GALLITANO-MENDEL, A., WEI, F., et al. 2005. Selective contribution of Egr1 (zif/268) to persistent inflammatory pain. *J Pain*, 6, 12-20.

- KOZASA, T., JIANG, X., HART, M. J., STERNWEIS, P. M., SINGER, W. D., et al. 1998. p115 RhoGEF, a GTPase activating protein for G α 12 and G α 13. *Science*, 280, 2109-11.
- KRUEGER, K. M., DAAKA, Y., PITCHER, J. A. & LEFKOWITZ, R. J. 1997. The role of sequestration in G protein-coupled receptor resensitization. Regulation of beta2-adrenergic receptor dephosphorylation by vesicular acidification. *J Biol Chem*, 272, 5-8.
- KRUPNICK, J. G., GUREVICH, V. V. & BENOVIĆ, J. L. 1997. Mechanism of quenching of phototransduction. Binding competition between arrestin and transducin for phosphorhodopsin. *J Biol Chem*, 272, 18125-31.
- KULKA, M., SHEEN, C. H., TANCOWNY, B. P., GRAMMER, L. C. & SCHLEIMER, R. P. 2008. Neuropeptides activate human mast cell degranulation and chemokine production. *Immunology*, 123, 398-410.
- KUNAPULI, P., LEE, S., ZHENG, W., ALBERTS, M., KORNIENKO, O., et al. 2006. Identification of small molecule antagonists of the human mas-related gene-X1 receptor. *Anal Biochem*, 351, 50-61.
- LABURTHE, M., COUVINEAU, A., GAUDIN, P., MAORET, J. J., ROUYER-FESSARD, C., et al. 1996. Receptors for VIP, PACAP, secretin, GRF, glucagon, GLP-1, and other members of their new family of G protein-linked receptors: structure-function relationship with special reference to the human VIP-1 receptor. *Ann N Y Acad Sci*, 805, 94-109; discussion 110-1.
- LAEMMLI, U. K. 1970. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-5.
- LAMB, M. E., DE WEERD, W. F. & LEEB-LUNDBERG, L. M. 2001. Agonist-promoted trafficking of human bradykinin receptors: arrestin- and dynamin-independent sequestration of the B2 receptor and bradykinin in HEK293 cells. *Biochem J*, 355, 741-50.
- LAMBERT, N. A., JOHNSTON, C. A., CAPPELL, S. D., KURAVI, S., KIMPLE, A. J., et al. 2010. Regulators of G-protein signaling accelerate GPCR signaling kinetics and govern sensitivity solely by accelerating GTPase activity. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107, 7066-71.
- LAPORTE, S. A., OAKLEY, R. H., ZHANG, J., HOLT, J. A., FERGUSON, S. S., et al. 1999. The beta2-adrenergic receptor/betaarrestin complex recruits the clathrin adaptor AP-2 during endocytosis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 3712-7.
- LAUGWITZ, K. L., ALLGEIER, A., OFFERMANN, S., SPICHER, K., VAN SANDE, J., et al. 1996. The human thyrotropin receptor: a heptahelical receptor capable of stimulating members of all four G protein families. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 116-20.
- LAVOIE, C., MERCIER, J. F., SALAHPOUR, A., UMAPATHY, D., BREIT, A., et al. 2002. Beta 1/beta 2-adrenergic receptor heterodimerization regulates beta 2-adrenergic receptor internalization and ERK signaling efficacy. *J Biol Chem*, 277, 35402-10.
- LEE, C. W., LEE, K. H., LEE, S. B., PARK, D. & RHEE, S. G. 1994. Regulation of phospholipase C-beta 4 by ribonucleotides and the alpha subunit of Gq. *J Biol Chem*, 269, 25335-8.
- LEFKOWITZ, R. J. & SHENOY, S. K. 2005. Transduction of receptor signals by beta-arrestins. *Science*, 308, 512-7.
- LEHMANN, D. M., SENEVIRATNE, A. M. & SMRCKA, A. V. 2008. Small molecule disruption of G protein beta gamma subunit signaling inhibits neutrophil chemotaxis and inflammation. *Mol Pharmacol*, 73, 410-8.
- LEMBO, P. M., GRAZZINI, E., GROBLEWSKI, T., O'DONNELL, D., ROY, M. O., et al. 2002. Proenkephalin A gene products activate a new family of sensory neuron-specific GPCRs. *Nat Neurosci*, 5, 201-9.
- LI, H., RAO, A. & HOGAN, P. G. 2011. Interaction of calcineurin with substrates and targeting proteins. *Trends Cell Biol*, 21, 91-103.
- LI, Y., JI, A., WEIHE, E. & SCHAFER, M. K. 2004. Cell-specific expression and lipopolysaccharide-induced regulation of tumor necrosis factor alpha (TNFalpha) and TNF receptors in rat dorsal root ganglion. *J Neurosci*, 24, 9623-31.

- LIU, Q., TANG, Z., SURDENIKOVA, L., KIM, S., PATEL, K. N., et al. 2009. Sensory neuron-specific GPCR Mrgprs are itch receptors mediating chloroquine-induced pruritus. *Cell*, 139, 1353-65.
- LOHOFF, M., GIAISI, M., KOHLER, R., CASPER, B., KRAMMER, P. H., et al. 2010. Early growth response protein-1 (Egr-1) is preferentially expressed in T helper type 2 (Th2) cells and is involved in acute transcription of the Th2 cytokine interleukin-4. *J Biol Chem*, 285, 1643-52.
- LOHSE, M. J., BENOVIĆ, J. L., CODINA, J., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. 1990. beta-Arrestin: a protein that regulates beta-adrenergic receptor function. *Science*, 248, 1547-50.
- LUKACS, V., THYAGARAJAN, B., VARNAI, P., BALLA, A., BALLA, T., et al. 2007. Dual regulation of TRPV1 by phosphoinositides. *J Neurosci*, 27, 7070-80.
- LUO, J., BUSILLO, J. M. & BENOVIĆ, J. L. 2008. M3 muscarinic acetylcholine receptor-mediated signaling is regulated by distinct mechanisms. *Mol Pharmacol*, 74, 338-47.
- LUTTRELL, L. M., FERGUSON, S. S., DAAKA, Y., MILLER, W. E., MAUDSLEY, S., et al. 1999. Beta-arrestin-dependent formation of beta2 adrenergic receptor-Src protein kinase complexes. *Science*, 283, 655-61.
- LUTTRELL, L. M. & GESTY-PALMER, D. 2010. Beyond desensitization: physiological relevance of arrestin-dependent signaling. *Pharmacol Rev*, 62, 305-30.
- LUTTRELL, L. M., ROUDABUSH, F. L., CHOY, E. W., MILLER, W. E., FIELD, M. E., et al. 2001. Activation and targeting of extracellular signal-regulated kinases by beta-arrestin scaffolds. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 2449-54.
- MA, Q., FODE, C., GUILLEMOT, F. & ANDERSON, D. J. 1999. Neurogenin1 and neurogenin2 control two distinct waves of neurogenesis in developing dorsal root ganglia. *Genes Dev*, 13, 1717-28.
- MA, W., ST-JACQUES, B. & DUARTE, P. C. 2012. Targeting pain mediators induced by injured nerve-derived COX2 and PGE2 to treat neuropathic pain. *Expert Opin Ther Targets*, 16, 527-40.
- MACIAN, F. 2005. NFAT proteins: key regulators of T-cell development and function. *Nat Rev Immunol*, 5, 472-84.
- MAEDA, S., WU, S., JUPPNER, H., GREEN, J., ARAGAY, A. M., et al. 1996. Cell-specific signal transduction of parathyroid hormone (PTH)-related protein through stably expressed recombinant PTH/PTHrP receptors in vascular smooth muscle cells. *Endocrinology*, 137, 3154-62.
- MAEDA, T., KIGUCHI, N., KOBAYASHI, Y., OZAKI, M. & KISHIOKA, S. 2008. Pioglitazone attenuates tactile allodynia and thermal hyperalgesia in mice subjected to peripheral nerve injury. *J Pharmacol Sci*, 108, 341-7.
- MALIK, L., KELLY, N. M., MA, J. N., CURRIER, E. A., BURSTEIN, E. S., et al. 2009. Discovery of non-peptidergic MrgX1 and MrgX2 receptor agonists and exploration of an initial SAR using solid-phase synthesis. *Bioorg Med Chem Lett*, 19, 1729-32.
- MALMBERG, A. B., HEDLEY, L. R., JASPER, J. R., HUNTER, J. C. & BASBAUM, A. I. 2001. Contribution of alpha(2) receptor subtypes to nerve injury-induced pain and its regulation by dexmedetomidine. *Br J Pharmacol*, 132, 1827-36.
- MARTIN, N. P., LEFKOWITZ, R. J. & SHENOY, S. K. 2003. Regulation of V2 vasopressin receptor degradation by agonist-promoted ubiquitination. *J Biol Chem*, 278, 45954-9.
- MARUYAMA, I., HASEGAWA, T., YAMAMOTO, T. & MOMOSE, K. 1989. Effects of pluronic F-127 on loading of fura 2/AM into single smooth muscle cells isolated from guinea pig taenia coli. *J Toxicol Sci*, 14, 153-63.
- MASHIMO, T., TAKIZAWA, A., VOIGT, B., YOSHIMI, K., HIAI, H., et al. 2010. Generation of knockout rats with X-linked severe combined immunodeficiency (X-SCID) using zinc-finger nucleases. *PLoS One*, 5, e8870.

- MATSUZAWA-YANAGIDA, K., NARITA, M., NAKAJIMA, M., KUZUMAKI, N., NIIKURA, K., et al. 2008. Usefulness of antidepressants for improving the neuropathic pain-like state and pain-induced anxiety through actions at different brain sites. *Neuropsychopharmacology*, 33, 1952-65.
- MCGIVERN, J. G. 2006. Targeting N-type and T-type calcium channels for the treatment of pain. *Drug Discov Today*, 11, 245-53.
- MCILVAIN, H. B., BAUDY, A., SULLIVAN, K., LIU, D., PONG, K., et al. 2006. Pituitary adenylate cyclase-activating peptide (PACAP) induces differentiation in the neuronal F11 cell line through a PKA-dependent pathway. *Brain Res*, 1077, 16-23.
- MELOCHE, S. & POUYSSEGUR, J. 2007. The ERK1/2 mitogen-activated protein kinase pathway as a master regulator of the G1- to S-phase transition. *Oncogene*, 26, 3227-39.
- MENARD, L., FERGUSON, S. S., ZHANG, J., LIN, F. T., LEFKOWITZ, R. J., et al. 1997. Synergistic regulation of beta2-adrenergic receptor sequestration: intracellular complement of beta-adrenergic receptor kinase and beta-arrestin determine kinetics of internalization. *Mol Pharmacol*, 51, 800-8.
- MERSKEY, H. & BOGDUK, N. 1994a. Classification of chronic pain. *Seattle: IASP Press*.
- MERSKEY, H., BOGDUK, N. & EDITORS 1994b. Part III: Pain terms, a current list with definitions and notes on usage. IASP task force on taxonomy. *Seattle: IASP Press*, 209-14.
- MILASTA, S., PEDIANI, J., APPELBE, S., TRIM, S., WYATT, M., et al. 2006. Interactions between the Mas-related receptors MrgD and MrgE alter signalling and trafficking of MrgD. *Mol Pharmacol*, 69, 479-91.
- MIRALLES, F., POSERN, G., ZAROMYTIDOU, A. I. & TREISMAN, R. 2003. Actin dynamics control SRF activity by regulation of its coactivator MAL. *Cell*, 113, 329-42.
- MITCHELL, R., MCCULLOCH, D., LUTZ, E., JOHNSON, M., MACKENZIE, C., et al. 1998. Rhodopsin-family receptors associate with small G proteins to activate phospholipase D. *Nature*, 392, 411-4.
- MOLLEREAU, C., MAZARGUIL, H., MARCUS, D., QUELVEN, I., KOTANI, M., et al. 2002. Pharmacological characterization of human NPFF(1) and NPFF(2) receptors expressed in CHO cells by using NPY Y(1) receptor antagonists. *Eur J Pharmacol*, 451, 245-56.
- MORENO, C., HOFFMAN, M., STODOLA, T. J., DIDIER, D. N., LAZAR, J., et al. 2011. Creation and characterization of a renin knockout rat. *Hypertension*, 57, 614-9.
- MORISE, H., SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & WINANT, J. 1974. Intermolecular energy transfer in the bioluminescent system of Aequorea. *Biochemistry*, 13, 2656-62.
- MORIYAMA, T., HIGASHI, T., TOGASHI, K., IIDA, T., SEGI, E., et al. 2005. Sensitization of TRPV1 by EP1 and IP reveals peripheral nociceptive mechanism of prostaglandins. *Mol Pain*, 1, 3.
- MORIYAMA, T., IIDA, T., KOBAYASHI, K., HIGASHI, T., FUKUOKA, T., et al. 2003. Possible involvement of P2Y2 metabotropic receptors in ATP-induced transient receptor potential vanilloid receptor 1-mediated thermal hypersensitivity. *J Neurosci*, 23, 6058-62.
- MUEHLICH, S., WANG, R., LEE, S. M., LEWIS, T. C., DAI, C., et al. 2008. Serum-induced phosphorylation of the serum response factor coactivator MKL1 by the extracellular signal-regulated kinase 1/2 pathway inhibits its nuclear localization. *Mol Cell Biol*, 28, 6302-13.
- MURPHY, P. M. 2002. International Union of Pharmacology. XXX. Update on chemokine receptor nomenclature. *Pharmacol Rev*, 54, 227-9.
- MURPHY, P. M., BAGGIOLINI, M., CHARO, I. F., HEBERT, C. A., HORUK, R., et al. 2000. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*, 52, 145-76.
- MYERS, S. J., WONG, L. M. & CHARO, I. F. 1995. Signal transduction and ligand specificity of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor in transfected embryonic kidney cells. *J Biol Chem*, 270, 5786-92.
- NAMKUNG, Y. & SIBLEY, D. R. 2004. Protein kinase C mediates phosphorylation, desensitization, and trafficking of the D2 dopamine receptor. *J Biol Chem*, 279, 49533-41.

- NANTEL, F., BONIN, H., EMORINE, L. J., ZILBERFARB, V., STROSBURG, A. D., et al. 1993. The human beta 3-adrenergic receptor is resistant to short term agonist-promoted desensitization. *Mol Pharmacol*, 43, 548-55.
- NANTEL, F., MARULLO, S., KRIEF, S., STROSBURG, A. D. & BOUVIER, M. 1994. Cell-specific down-regulation of the beta 3-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 269, 13148-55.
- NDONG, C., PRADHAN, A., PUMA, C., MORELLO, J. P., HOFFERT, C., et al. 2009. Role of rat sensory neuron-specific receptor (rSNSR1) in inflammatory pain: contribution of TRPV1 to SNSR signaling in the pain pathway. *Pain*, 143, 130-7.
- NEHER, E. & SAKMANN, B. 1976. Single-channel currents recorded from membrane of denervated frog muscle fibres. *Nature*, 260, 799-802.
- NEVES, S. R., RAM, P. T. & IYENGAR, R. 2002. G protein pathways. *Science*, 296, 1636-9.
- NGUYEN, T. & DI GIOVANNI, S. 2008. NFAT signaling in neural development and axon growth. *Int J Dev Neurosci*, 26, 141-5.
- NUMAZAKI, M., TOMINAGA, T., TOYOOKA, H. & TOMINAGA, M. 2002. Direct phosphorylation of capsaicin receptor VR1 by protein kinase Cepsilon and identification of two target serine residues. *J Biol Chem*, 277, 13375-8.
- O'CONNOR, A. B. & DWORKIN, R. H. 2009. Treatment of neuropathic pain: an overview of recent guidelines. *Am J Med*, 122, S22-32.
- OAKLEY, R. H., LAPORTE, S. A., HOLT, J. A., BARAK, L. S. & CARON, M. G. 1999. Association of beta-arrestin with G protein-coupled receptors during clathrin-mediated endocytosis dictates the profile of receptor resensitization. *J Biol Chem*, 274, 32248-57.
- OAKLEY, R. H., LAPORTE, S. A., HOLT, J. A., CARON, M. G. & BARAK, L. S. 2000. Differential affinities of visual arrestin, beta arrestin1, and beta arrestin2 for G protein-coupled receptors delineate two major classes of receptors. *J Biol Chem*, 275, 17201-10.
- OBATA, K. & NOGUCHI, K. 2006. BDNF in sensory neurons and chronic pain. *Neurosci Res*, 55, 1-10.
- OHATA, T., IKEMI, Y., MURAKAMI, M., IMAGAWA, T., OTSUGURO, K., et al. 2006. Potentiation of transient receptor potential V1 functions by the activation of metabotropic 5-HT receptors in rat primary sensory neurons. *J Physiol*, 576, 809-22.
- OKADA, T., SUGIHARA, M., BONDAR, A. N., ELSTNER, M., ENTEL, P., et al. 2004. The retinal conformation and its environment in rhodopsin in light of a new 2.2 Å crystal structure. *J Mol Biol*, 342, 571-83.
- OLAH, Z., KARAI, L. & IADAROLA, M. J. 2002. Protein kinase C(alpha) is required for vanilloid receptor 1 activation. Evidence for multiple signaling pathways. *J Biol Chem*, 277, 35752-9.
- OOSTEROM, J., NIJENHUIS, W. A., SCHAAPER, W. M., SLOOTSTRA, J., MELOEN, R. H., et al. 1999. Conformation of the core sequence in melanocortin peptides directs selectivity for the melanocortin MC3 and MC4 receptors. *J Biol Chem*, 274, 16853-60.
- OSMOND, R. I., SHEEHAN, A., BOROWICZ, R., BARNETT, E., HARVEY, G., et al. 2005. GPCR screening via ERK 1/2: a novel platform for screening G protein-coupled receptors. *J Biomol Screen*, 10, 730-7.
- OWEN, C. S. 1988. Phorbol ester (12-O-tetradecanoylphorbol 13-acetate) partially inhibits rapid intracellular free calcium transients triggered by anti-immunoglobulin in murine lymphocytes. *J Biol Chem*, 263, 2732-7.
- PALCZEWSKI, K., KUMASAKA, T., HORI, T., BEHNKE, C. A., MOTOSHIMA, H., et al. 2000. Crystal structure of rhodopsin: A G protein-coupled receptor. *Science*, 289, 739-45.
- PALS-RYLAARSDAM, R., GUREVICH, V. V., LEE, K. B., PTASIENSKI, J. A., BENOVIĆ, J. L., et al. 1997. Internalization of the m2 muscarinic acetylcholine receptor. Arrestin-independent and -dependent pathways. *J Biol Chem*, 272, 23682-9.
- PAN, H. L., WU, Z. Z., ZHOU, H. Y., CHEN, S. R., ZHANG, H. M., et al. 2008. Modulation of pain transmission by G-protein-coupled receptors. *Pharmacol Ther*, 117, 141-61.

- PAREEK, T. K., KELLER, J., KESAVAPANY, S., AGARWAL, N., KUNER, R., et al. 2007. Cyclin-dependent kinase 5 modulates nociceptive signaling through direct phosphorylation of transient receptor potential vanilloid 1. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 660-5.
- PAREEK, T. K., KELLER, J., KESAVAPANY, S., PANT, H. C., IADAROLA, M. J., et al. 2006a. Cyclin-dependent kinase 5 activity regulates pain signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103, 791-6.
- PAREEK, T. K. & KULKARNI, A. B. 2006b. Cdk5: a new player in pain signaling. *Cell Cycle*, 5, 585-8.
- PENN, R. B., PASCUAL, R. M., KIM, Y. M., MUNDELL, S. J., KRYMSKAYA, V. P., et al. 2001. Arrestin specificity for G protein-coupled receptors in human airway smooth muscle. *J Biol Chem*, 276, 32648-56.
- PFAFFINGER, P. J., MARTIN, J. M., HUNTER, D. D., NATHANSON, N. M. & HILLE, B. 1985. GTP-binding proteins couple cardiac muscarinic receptors to a K channel. *Nature*, 317, 536-8.
- PHILLIPS, R. J., LUTZ, M. & PREMACK, B. 2005. Differential signaling mechanisms regulate expression of CC chemokine receptor-2 during monocyte maturation. *J Inflamm (Lond)*, 2, 14.
- PIERCE, K. L., PREMONT, R. T. & LEFKOWITZ, R. J. 2002. Seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 3, 639-50.
- PITCHER, J. A., TESMER, J. J., FREEMAN, J. L., CAPEL, W. D., STONE, W. C., et al. 1999. Feedback inhibition of G protein-coupled receptor kinase 2 (GRK2) activity by extracellular signal-regulated kinases. *J Biol Chem*, 274, 34531-4.
- PITCHER, J. A., TOUHARA, K., PAYNE, E. S. & LEFKOWITZ, R. J. 1995. Pleckstrin homology domain-mediated membrane association and activation of the beta-adrenergic receptor kinase requires coordinate interaction with G beta gamma subunits and lipid. *J Biol Chem*, 270, 11707-10.
- PLANT, T. D., ZOLLNER, C., KEPURA, F., MOUSA, S. S., EICHHORST, J., et al. 2007. Endothelin potentiates TRPV1 via ETA receptor-mediated activation of protein kinase C. *Mol Pain*, 3, 35.
- PLATIKA, D., BAIZER, L. & FISHMAN, M. C. 1985a. Sensory neurons "immortalized" by fusion with neuroblastoma cells. *Trans Assoc Am Physicians*, 98, 301-4.
- PLATIKA, D., BOULOS, M. H., BAIZER, L. & FISHMAN, M. C. 1985b. Neuronal traits of clonal cell lines derived by fusion of dorsal root ganglia neurons with neuroblastoma cells. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 82, 3499-503.
- PREMKUMAR, L. S. & AHERN, G. P. 2000. Induction of vanilloid receptor channel activity by protein kinase C. *Nature*, 408, 985-90.
- PRESCOTT, E. D. & JULIUS, D. 2003. A modular PIP2 binding site as a determinant of capsaicin receptor sensitivity. *Science*, 300, 1284-8.
- PUTTFARCKEN, P. S., MANELLI, A. M., ARNERIC, S. P. & DONNELLY-ROBERTS, D. L. 1997. Evidence for nicotinic receptors potentially modulating nociceptive transmission at the level of the primary sensory neuron: studies with F11 cells. *J Neurochem*, 69, 930-8.
- QIN, N., PLATANO, D., OLCESSE, R., STEFANI, E. & BIRNBAUMER, L. 1997. Direct interaction of gbetagamma with a C-terminal gbetagamma-binding domain of the Ca2+ channel alpha subunit is responsible for channel inhibition by G protein-coupled receptors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 8866-71.
- QUIRION, R. & WEISS, A. S. 1983. Peptide E and other proenkephalin-derived peptides are potent kappa opiate receptor agonists. *Peptides*, 4, 445-9.
- RAJAGOPAL, S., RAJAGOPAL, K. & LEFKOWITZ, R. J. 2010. Teaching old receptors new tricks: biasing seven-transmembrane receptors. *Nat Rev Drug Discov*, 9, 373-86.
- RAMANAN, N., SHEN, Y., SARSFIELD, S., LEMBERGER, T., SCHUTZ, G., et al. 2005. SRF mediates activity-induced gene expression and synaptic plasticity but not neuronal viability. *Nat Neurosci*, 8, 759-67.

- RAMSEY, I. S., DELLING, M. & CLAPHAM, D. E. 2006. An introduction to TRP channels. *Annu Rev Physiol*, 68, 619-47.
- RASMUSSEN, S. G., DEVREE, B. T., ZOU, Y., KRUSE, A. C., CHUNG, K. Y., et al. 2011. Crystal structure of the beta2 adrenergic receptor-Gs protein complex. *Nature*, 477, 549-55.
- RHEE, S. G. 2001. Regulation of phosphoinositide-specific phospholipase C. *Annu Rev Biochem*, 70, 281-312.
- RO, J. Y., LEE, J. S. & ZHANG, Y. 2009. Activation of TRPV1 and TRPA1 leads to muscle nociception and mechanical hyperalgesia. *Pain*, 144, 270-7.
- ROBAS, N., MEAD, E. & FIDOCK, M. 2003. MrgX2 is a high potency cortistatin receptor expressed in dorsal root ganglion. *J Biol Chem*, 278, 44400-4.
- ROMERO, A., GONZALEZ-CUELLO, A., LAORDEN, M. L., CAMPILLO, A., VASCONCELOS, N., et al. 2012. Effects of surgery and/or remifentanyl administration on the expression of pERK1/2, c-Fos and dynorphin in the dorsal root ganglia in mice. *Naunyn Schmiedebergs Arch Pharmacol*, 385, 397-409.
- ROSENBAUM, T., GORDON-SHAAG, A., MUNARI, M. & GORDON, S. E. 2004. Ca²⁺/calmodulin modulates TRPV1 activation by capsaicin. *J Gen Physiol*, 123, 53-62.
- ROSS, E. M. & GILMAN, A. G. 1977a. Reconstitution of catecholamine-sensitive adenylate cyclase activity: interactions of solubilized components with receptor-replete membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 74, 3715-9.
- ROSS, E. M. & GILMAN, A. G. 1977b. Resolution of some components of adenylate cyclase necessary for catalytic activity. *J Biol Chem*, 252, 6966-9.
- ROTHER, K., SOLINSKI, H. J., BOEKHOFF, I., GUDERMANN, T. & BREIT, A. 2012. Morphine Activates the E Twenty Six-Like Transcription Factor-1/Serum Response Factor Pathway via Extracellular Signal-Regulated Kinases 1/2 in F11 Cells Derived from Dorsal Root Ganglia Neurons. *J Pharmacol Exp Ther*, 342, 41-52.
- RUBINFELD, H. & SEGER, R. 2005. The ERK cascade: a prototype of MAPK signaling. *Mol Biotechnol*, 31, 151-74.
- RUGIERO, F. & WOOD, J. N. 2009. The mechanosensitive cell line ND-C does not express functional thermoTRP channels. *Neuropharmacology*, 56, 1138-46.
- RYU, S., LIU, B., YAO, J., FU, Q. & QIN, F. 2007. Uncoupling proton activation of vanilloid receptor TRPV1. *J Neurosci*, 27, 12797-807.
- SAEGUSA, H., KURIHARA, T., ZONG, S., KAZUNO, A., MATSUDA, Y., et al. 2001. Suppression of inflammatory and neuropathic pain symptoms in mice lacking the N-type Ca²⁺ channel. *EMBO J*, 20, 2349-56.
- SAIKKONEN, B., PAREEK, T. K., AGARWAL, N., MOLINOLO, A., KRIETE, M., et al. 2008. Conditional deletion of cyclin-dependent kinase 5 in primary sensory neurons leads to atypical skin lesions. *Cell Cycle*, 7, 750-3.
- SAKURADA, T., KATSUMATA, K., TAN-NO, K., SAKURADA, S. & KISARA, K. 1992. The capsaicin test in mice for evaluating tachykinin antagonists in the spinal cord. *Neuropharmacology*, 31, 1279-85.
- SALOMON, Y., LONDOS, C. & RODBELL, M. 1974. A highly sensitive adenylate cyclase assay. *Anal Biochem*, 58, 541-8.
- SAMAMA, P., COTECCHIA, S., COSTA, T. & LEFKOWITZ, R. J. 1993. A mutation-induced activated state of the beta 2-adrenergic receptor. Extending the ternary complex model. *J Biol Chem*, 268, 4625-36.
- SARANTOPOULOS, C. D., MCCALLUM, J. B., RIGAUD, M., FUCHS, A., KWOK, W. M., et al. 2007. Opposing effects of spinal nerve ligation on calcium-activated potassium currents in axotomized and adjacent mammalian primary afferent neurons. *Brain Res*, 1132, 84-99.
- SCHMIDT, R., BUTTERWORTH, J., O'DONNELL, D., SANTHAKUMAR, V. & TOMASZEWSKI, M. 2009. Cyclic dimers of C-terminal gamma2-MSH analogs as selective antagonists of the human sensory nerve-specific receptor (SNSR-4). *Adv Exp Med Biol*, 611, 111-2.

- SCHOLZ, J. & WOOLF, C. J. 2007. The neuropathic pain triad: neurons, immune cells and glia. *Nat Neurosci*, 10, 1361-8.
- SCHONEBERG, T., SCHULTZ, G. & GUDERMANN, T. 1999. Structural basis of G protein-coupled receptor function. *Mol Cell Endocrinol*, 151, 181-93.
- SCHULTE, G. 2010. International Union of Basic and Clinical Pharmacology. LXXX. The class Frizzled receptors. *Pharmacol Rev*, 62, 632-67.
- SCHWARZ, S., GREFFRATH, W., BUSSELBERG, D. & TREEDE, R. D. 2000. Inactivation and tachyphylaxis of heat-evoked inward currents in nociceptive primary sensory neurones of rats. *J Physiol*, 528, 539-49.
- SERRANO, A., PARE, M., MCINTOSH, F., ELMES, S. J., MARTINO, G., et al. 2010. Blocking spinal CCR2 with AZ889 reversed hyperalgesia in a model of neuropathic pain. *Mol Pain*, 6, 90.
- SETA, K., NANAMORI, M., MODRALL, J. G., NEUBIG, R. R. & SADOSHIMA, J. 2002. AT1 receptor mutant lacking heterotrimeric G protein coupling activates the Src-Ras-ERK pathway without nuclear translocation of ERKs. *J Biol Chem*, 277, 9268-77.
- SEYBOLD, V. S., COICOU, L. G., GROTH, R. D. & MERMELSTEIN, P. G. 2006. Substance P initiates NFAT-dependent gene expression in spinal neurons. *J Neurochem*, 97, 397-407.
- SHAW, J. P., UTZ, P. J., DURAND, D. B., TOOLE, J. J., EMMEL, E. A., et al. 1988. Identification of a putative regulator of early T cell activation genes. *Science*, 241, 202-5.
- SHAYWITZ, A. J. & GREENBERG, M. E. 1999. CREB: a stimulus-induced transcription factor activated by a diverse array of extracellular signals. *Annu Rev Biochem*, 68, 821-61.
- SHEMESH, R., TOPORIK, A., LEVINE, Z., HECHT, I., ROTMAN, G., et al. 2008. Discovery and validation of novel peptide agonists for G-protein-coupled receptors. *J Biol Chem*, 283, 34643-9.
- SHERRINGTON, C. S. 1903. Qualitative difference of spinal reflex corresponding with qualitative difference of cutaneous stimulus. *J Physiol*, 30, 39-46.
- SHIM, W. S., TAK, M. H., LEE, M. H., KIM, M., KOO, J. Y., et al. 2007. TRPV1 mediates histamine-induced itching via the activation of phospholipase A2 and 12-lipoxygenase. *J Neurosci*, 27, 2331-7.
- SHIMOMURA, O., JOHNSON, F. H. & MORISE, H. 1974. Mechanism of the luminescent intramolecular reaction of aequorin. *Biochemistry*, 13, 3278-86.
- SHIN, J., CHO, H., HWANG, S. W., JUNG, J., SHIN, C. Y., et al. 2002. Bradykinin-12-lipoxygenase-VR1 signaling pathway for inflammatory hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 10150-5.
- SHINOHARA, T., HARADA, M., OGI, K., MARUYAMA, M., FUJII, R., et al. 2004. Identification of a G protein-coupled receptor specifically responsive to beta-alanine. *J Biol Chem*, 279, 23559-64.
- SIBLEY, D. R. & LEFKOWITZ, R. J. 1985a. Molecular mechanisms of receptor desensitization using the beta-adrenergic receptor-coupled adenylate cyclase system as a model. *Nature*, 317, 124-9.
- SIBLEY, D. R., STRASSER, R. H., CARON, M. G. & LEFKOWITZ, R. J. 1985b. Homologous desensitization of adenylate cyclase is associated with phosphorylation of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 260, 3883-6.
- SIKAND, P., DONG, X. & LAMOTTE, R. H. 2011. BAM8-22 Peptide Produces Itch and Nociceptive Sensations in Humans Independent of Histamine Release. *J Neurosci*, 31, 7563-7.
- SIKAND, P., SHIMADA, S. G., GREEN, B. G. & LAMOTTE, R. H. 2009. Similar itch and nociceptive sensations evoked by punctate cutaneous application of capsaicin, histamine and cowhage. *Pain*, 144, 66-75.
- SIMONDS, W. F. 1999. G protein regulation of adenylate cyclase. *Trends Pharmacol Sci*, 20, 66-73.

- SIMONE, D. A., BAUMANN, T. K. & LAMOTTE, R. H. 1989. Dose-dependent pain and mechanical hyperalgesia in humans after intradermal injection of capsaicin. *Pain*, 38, 99-107.
- SMRCKA, A. V., HEPLER, J. R., BROWN, K. O. & STERNWEIS, P. C. 1991. Regulation of polyphosphoinositide-specific phospholipase C activity by purified Gq. *Science*, 251, 804-7.
- SNIDER, W. D. & MCMAHON, S. B. 1998. Tackling pain at the source: new ideas about nociceptors. *Neuron*, 20, 629-32.
- SOLINSKI, H. J. 2008. Spezies-spezifische Unterschiede der Agonisten-induzierten Desensitisierung innerhalb der Familie der Mrg-Rezeptoren. *Diplomarbeit, Philipps-Universität Marburg*.
- SOLINSKI, H. J., BOEKHOFF, I., BOUVIER, M., GUDERMANN, T. & BREIT, A. 2010. Sensory neuron-specific MAS-related gene-X1 receptors resist agonist-promoted endocytosis. *Mol Pharmacol*, 78, 249-59.
- SOLINSKI, H. J., ZIERLER, S., GUDERMANN, T. & BREIT, A. 2012. Human Sensory Neuron-specific Mas-related G Protein-coupled Receptors-X1 Sensitize and Directly Activate Transient Receptor Potential Cation Channel V1 via Distinct Signaling Pathways. *J Biol Chem*, 287, 40956-71.
- STAATS, P. S., YEARWOOD, T., CHARAPATA, S. G., PRESLEY, R. W., WALLACE, M. S., et al. 2004. Intrathecal ziconotide in the treatment of refractory pain in patients with cancer or AIDS: a randomized controlled trial. *JAMA*, 291, 63-70.
- STEIN, A. T., UFRET-VINCENTY, C. A., HUA, L., SANTANA, L. F. & GORDON, S. E. 2006. Phosphoinositide 3-kinase binds to TRPV1 and mediates NGF-stimulated TRPV1 trafficking to the plasma membrane. *J Gen Physiol*, 128, 509-22.
- STRATHMANN, M., WILKIE, T. M. & SIMON, M. I. 1989. Diversity of the G-protein family: sequences from five additional alpha subunits in the mouse. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 7407-9.
- STRATHMANN, M. P. & SIMON, M. I. 1991. G alpha 12 and G alpha 13 subunits define a fourth class of G protein alpha subunits. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 88, 5582-6.
- SU, J. H., CHEN, Y. F., TANG, J. R., WU, L., ZHANG, P., et al. 2010. Protective effects of the calcium-channel blocker flunarizine on crush injury of sciatic nerves in a rat model. *Neurol India*, 58, 530-6.
- SUBRAMANIAN, H., GUPTA, K., GUO, Q., PRICE, R. & ALI, H. 2011a. Mas-related gene X2 (MrgX2) is a novel G protein-coupled receptor for the antimicrobial peptide LL-37 in human mast cells: resistance to receptor phosphorylation, desensitization, and internalization. *J Biol Chem*, 286, 44739-49.
- SUBRAMANIAN, H., KASHEM, S. W., COLLINGTON, S. J., QU, H., LAMBRIS, J. D., et al. 2011b. PMX-53 as a dual CD88 antagonist and an agonist for Mas-related gene 2 (MrgX2) in human mast cells. *Mol Pharmacol*, 79, 1005-13.
- SUN, J. H., YANG, B., DONNELLY, D. F., MA, C. & LAMOTTE, R. H. 2006. MCP-1 enhances excitability of nociceptive neurons in chronically compressed dorsal root ganglia. *J Neurophysiol*, 96, 2189-99.
- SUZUKI, N., NAKAMURA, S., MANO, H. & KOZASA, T. 2003. Galpha 12 activates Rho GTPase through tyrosine-phosphorylated leukemia-associated RhoGEF. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 733-8.
- SWANSON, D. M., DUBIN, A. E., SHAH, C., NASSER, N., CHANG, L., et al. 2005. Identification and biological evaluation of 4-(3-trifluoromethylpyridin-2-yl)piperazine-1-carboxylic acid (5-trifluoromethylpyridin-2-yl)amide, a high affinity TRPV1 (VR1) vanilloid receptor antagonist. *J Med Chem*, 48, 1857-72.
- TAKAHASHI, S., OHSHIMA, T., CHO, A., SREENATH, T., IADAROLA, M. J., et al. 2005. Increased activity of cyclin-dependent kinase 5 leads to attenuation of cocaine-mediated dopamine signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 1737-42.

- TAKEICHI, M. 1990. Cadherins: a molecular family important in selective cell-cell adhesion. *Annu Rev Biochem*, 59, 237-52.
- TANAKA, T., MINAMI, M., NAKAGAWA, T. & SATOH, M. 2004. Enhanced production of monocyte chemoattractant protein-1 in the dorsal root ganglia in a rat model of neuropathic pain: possible involvement in the development of neuropathic pain. *Neurosci Res*, 48, 463-9.
- TATEMOTO, K., NOZAKI, Y., TSUDA, R., KONNO, S., TOMURA, K., et al. 2006. Immunoglobulin E-independent activation of mast cell is mediated by Mrg receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, 349, 1322-8.
- TAUSSIG, R., QUARMBY, L. M. & GILMAN, A. G. 1993. Regulation of purified type I and type II adenylylcyclases by G protein beta gamma subunits. *J Biol Chem*, 268, 9-12.
- TAYLOR, S. J., CHAE, H. Z., RHEE, S. G. & EXTON, J. H. 1991. Activation of the beta 1 isozyme of phospholipase C by alpha subunits of the Gq class of G proteins. *Nature*, 350, 516-8.
- TERRILLON, S. & BOUVIER, M. 2004. Receptor activity-independent recruitment of betaarrestin2 reveals specific signalling modes. *EMBO J*, 23, 3950-61.
- THOMAS, P. & SMART, T. G. 2005. HEK293 cell line: a vehicle for the expression of recombinant proteins. *J Pharmacol Toxicol Methods*, 51, 187-200.
- TOKER, A. 1998. Signaling through protein kinase C. *Front Biosci*, 3, D1134-47.
- TOKSOZ, D. & MERDEK, K. D. 2002. The Rho small GTPase: functions in health and disease. *Histol Histopathol*, 17, 915-27.
- TOLKOVSKY, A. M. & LEVITZKI, A. 1978. Mode of coupling between the beta-adrenergic receptor and adenylate cyclase in turkey erythrocytes. *Biochemistry*, 17, 3795.
- TOMINAGA, M., CATERINA, M. J., MALMBERG, A. B., ROSEN, T. A., GILBERT, H., et al. 1998. The cloned capsaicin receptor integrates multiple pain-producing stimuli. *Neuron*, 21, 531-543.
- TOMINAGA, M., WADA, M. & MASU, M. 2001. Potentiation of capsaicin receptor activity by metabotropic ATP receptors as a possible mechanism for ATP-evoked pain and hyperalgesia. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 6951-6.
- TOWBIN, H., STAEBELIN, T. & GORDON, J. 1979. Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 76, 4350-4.
- TREISMAN, R. 1994. Ternary complex factors: growth factor regulated transcriptional activators. *Curr Opin Genet Dev*, 4, 96-101.
- TROCHU, J. N., LEBLAIS, V., RAUTUREAU, Y., BEVERELLI, F., LE MAREC, H., et al. 1999. Beta 3-adrenoceptor stimulation induces vasorelaxation mediated essentially by endothelium-derived nitric oxide in rat thoracic aorta. *Br J Pharmacol*, 128, 69-76.
- TRUMPP-KALLMEYER, S., CHINI, B., MOUILLAC, B., BARBERIS, C., HOFACK, J., et al. 1995. Towards understanding the role of the first extracellular loop for the binding of peptide hormones to G-protein coupled receptors. *Pharm Acta Helv*, 70, 255-62.
- TSUJI, F. I., INOUE, S., GOTO, T. & SAKAKI, Y. 1986. Site-specific mutagenesis of the calcium-binding photoprotein aequorin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 8107-11.
- UTRERAS, E., FUTATSUGI, A., RUDRABHATLA, P., KELLER, J., IADAROLA, M. J., et al. 2009. Tumor necrosis factor-alpha regulates cyclin-dependent kinase 5 activity during pain signaling through transcriptional activation of p35. *J Biol Chem*, 284, 2275-84.
- VAIDEHI, N. & KENAKIN, T. 2010. The role of conformational ensembles of seven transmembrane receptors in functional selectivity. *Curr Opin Pharmacol*, 10, 775-81.
- VALENZANO, K. J., GRANT, E. R., WU, G., HACHICHA, M., SCHMID, L., et al. 2003. N-(4-tertiarybutylphenyl)-4-(3-chloropyridin-2-yl)tetrahydropyrazine -1(2H)-carbox-amide (BCTC), a novel, orally effective vanilloid receptor 1 antagonist with analgesic properties: I. in vitro characterization and pharmacokinetic properties. *J Pharmacol Exp Ther*, 306, 377-86.

- VALLENDER, E. J. & LAHN, B. T. 2004. Positive selection on the human genome. *Hum Mol Genet*, 13 Spec No 2, R245-54.
- VAY, L., GU, C. & MCNAUGHTON, P. A. 2012. The thermo-TRP ion channel family: properties and therapeutic implications. *Br J Pharmacol*, 165, 787-801.
- VELLANI, V., KINSEY, A. M., PRANDINI, M., HECHTFISCHER, S. C., REEH, P., et al. 2010. Protease activated receptors 1 and 4 sensitize TRPV1 in nociceptive neurones. *Mol Pain*, 6, 61.
- VELLANI, V., MAPPLEBECK, S., MORIONDO, A., DAVIS, J. B. & MCNAUGHTON, P. A. 2001. Protein kinase C activation potentiates gating of the vanilloid receptor VR1 by capsaicin, protons, heat and anandamide. *J Physiol*, 534, 813-25.
- VENKATACHALAM, K. & MONTELL, C. 2007. TRP channels. *Annu Rev Biochem*, 76, 387-417.
- VILIM, F. S., AARNISALO, A. A., NIEMINEN, M. L., LINTUNEN, M., KARLSTEDT, K., et al. 1999. Gene for pain modulatory neuropeptide NPFF: induction in spinal cord by noxious stimuli. *Mol Pharmacol*, 55, 804-11.
- VOILLEY, N. 2004. Acid-sensing ion channels (ASICs): new targets for the analgesic effects of non-steroid anti-inflammatory drugs (NSAIDs). *Curr Drug Targets Inflamm Allergy*, 3, 71-9.
- WALKER, J. K., PREMONT, R. T., BARAK, L. S., CARON, M. G. & SHETZLINE, M. A. 1999. Properties of secretin receptor internalization differ from those of the beta(2)-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 274, 31515-23.
- WANG, C. H., ZOU, L. J., ZHANG, Y. L., JIAO, Y. F. & SUN, J. H. 2010. The excitatory effects of the chemokine CCL2 on DRG somata are greater after an injury of the ganglion than after an injury of the spinal or peripheral nerve. *Neurosci Lett*, 475, 48-52.
- WANG, T. T., YUAN, W. L., KE, Q., SONG, X. B., ZHOU, X., et al. 2006. Effects of electroacupuncture on the expression of c-jun and c-fos in spared dorsal root ganglion and associated spinal laminae following removal of adjacent dorsal root ganglia in cats. *Neuroscience*, 140, 1169-76.
- WANG, Y. X., PETTUS, M., GAO, D., PHILLIPS, C. & SCOTT BOWERSOX, S. 2000. Effects of intrathecal administration of ziconotide, a selective neuronal N-type calcium channel blocker, on mechanical allodynia and heat hyperalgesia in a rat model of postoperative pain. *Pain*, 84, 151-8.
- WEDEL, A. & ZIEGLER-HEITBROCK, H. W. 1995. The C/EBP family of transcription factors. *Immunobiology*, 193, 171-85.
- WEI, H., AHN, S., SHENOY, S. K., KARNIK, S. S., HUNYADY, L., et al. 2003. Independent beta-arrestin 2 and G protein-mediated pathways for angiotensin II activation of extracellular signal-regulated kinases 1 and 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10782-7.
- WHISTLER, J. L., CHUANG, H. H., CHU, P., JAN, L. Y. & VON ZASTROW, M. 1999. Functional dissociation of mu opioid receptor signaling and endocytosis: implications for the biology of opiate tolerance and addiction. *Neuron*, 23, 737-46.
- WHITE, F. A., BHANGOO, S. K. & MILLER, R. J. 2005. Chemokines: integrators of pain and inflammation. *Nat Rev Drug Discov*, 4, 834-44.
- WHITE, F. A., JUNG, H. & MILLER, R. J. 2007. Chemokines and the pathophysiology of neuropathic pain. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 104, 20151-8.
- WILDEN, U., HALL, S. W. & KUHN, H. 1986. Phosphodiesterase activation by photoexcited rhodopsin is quenched when rhodopsin is phosphorylated and binds the intrinsic 48-kDa protein of rod outer segments. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 83, 1174-8.
- WILKINSON, S. E., PARKER, P. J. & NIXON, J. S. 1993. Isoenzyme specificity of bisindolylmaleimides, selective inhibitors of protein kinase C. *Biochem J*, 294 (Pt 2), 335-7.
- WILLIAMS, J. T., CHRISTIE, M. J. & MANZONI, O. 2001. Cellular and synaptic adaptations mediating opioid dependence. *Physiol Rev*, 81, 299-343.

- WILLIAMS, L. T. & LEFKOWITZ, R. J. 1977. Slowly reversible binding of catecholamine to a nucleotide-sensitive state of the beta-adrenergic receptor. *J Biol Chem*, 252, 7207-13.
- WILSON, S. R., GERHOLD, K. A., BIFOLCK-FISHER, A., LIU, Q., PATEL, K. N., et al. 2011. TRPA1 is required for histamine-independent, Mas-related G protein-coupled receptor-mediated itch. *Nat Neurosci*, 14, 595-602.
- WISE, A., JUPE, S. C. & REES, S. 2004. The identification of ligands at orphan G-protein coupled receptors. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 44, 43-66.
- WOO, D. H., JUNG, S. J., ZHU, M. H., PARK, C. K., KIM, Y. H., et al. 2008. Direct activation of transient receptor potential vanilloid 1 (TRPV1) by diacylglycerol (DAG). *Mol Pain*, 4, 42.
- WOOD, J. N., BEVAN, S. J., COOTE, P. R., DUNN, P. M., HARMAR, A., et al. 1990. Novel cell lines display properties of nociceptive sensory neurons. *Proc Biol Sci*, 241, 187-94.
- WOOLF, C. J. & MA, Q. 2007. Nociceptors--noxious stimulus detectors. *Neuron*, 55, 353-64.
- WU, G., RINGKAMP, M., MURINSON, B. B., POGATZKI, E. M., HARTKE, T. V., et al. 2002. Degeneration of myelinated efferent fibers induces spontaneous activity in uninjured C-fiber afferents. *J Neurosci*, 22, 7746-53.
- YAMAMOTO, K., TAKESHIMA, H., HAMADA, K., NAKAO, M., KINO, T., et al. 1999. Cloning and functional characterization of the 5'-flanking region of the human monocyte chemoattractant protein-1 receptor (CCR2) gene. Essential role of 5'-untranslated region in tissue-specific expression. *J Biol Chem*, 274, 4646-54.
- YANG, Q. & LANIER, S. M. 1999. Influence of G protein type on agonist efficacy. *Mol Pharmacol*, 56, 651-6.
- YEATS, J. C., DOCHERTY, R. J. & BEVAN, S. 1992. Calcium-dependent and independent desensitization of capsaicin-evoked responses in voltage-clamped adult rat dorsal root ganglion (DRG) neurones in culture. *Proc Physiol Soc*, 446, 390P-392P.
- YOUNG, D., WAITCHES, G., BIRCHMEIER, C., FASANO, O. & WIGLER, M. 1986. Isolation and characterization of a new cellular oncogene encoding a protein with multiple potential transmembrane domains. *Cell*, 45, 711-9.
- ZARAIN-HERZBERG, A., FRAGOSO-MEDINA, J. & ESTRADA-AVILES, R. 2011. Calcium-regulated transcriptional pathways in the normal and pathologic heart. *IUBMB Life*, 63, 847-55.
- ZENG, X., HUANG, H. & HONG, Y. 2004. Effects of intrathecal BAM22 on noxious stimulus-evoked c-fos expression in the rat spinal dorsal horn. *Brain Res*, 1028, 170-9.
- ZHANG, J., BARAK, L. S., WINKLER, K. E., CARON, M. G. & FERGUSON, S. S. 1997. A central role for beta-arrestins and clathrin-coated vesicle-mediated endocytosis in beta2-adrenergic receptor resensitization. Differential regulation of receptor resensitization in two distinct cell types. *J Biol Chem*, 272, 27005-14.
- ZHANG, L., TAYLOR, N., XIE, Y., FORD, R., JOHNSON, J., et al. 2005a. Cloning and expression of MRG receptors in macaque, mouse, and human. *Brain Res Mol Brain Res*, 133, 187-97.
- ZHANG, N., ROGERS, T. J., CATERINA, M. & OPPENHEIM, J. J. 2004. Proinflammatory chemokines, such as C-C chemokine ligand 3, desensitize mu-opioid receptors on dorsal root ganglia neurons. *J Immunol*, 173, 594-9.
- ZHANG, X., HUANG, J. & MCNAUGHTON, P. A. 2005b. NGF rapidly increases membrane expression of TRPV1 heat-gated ion channels. *EMBO J*, 24, 4211-23.
- ZHANG, X., LI, L. & MCNAUGHTON, P. A. 2008. Proinflammatory mediators modulate the heat-activated ion channel TRPV1 via the scaffolding protein AKAP79/150. *Neuron*, 59, 450-61.
- ZHU, W. & OXFORD, G. S. 2007. Phosphoinositide-3-kinase and mitogen activated protein kinase signaling pathways mediate acute NGF sensitization of TRPV1. *Mol Cell Neurosci*, 34, 689-700.

Literaturverzeichnis

- ZSCHEMISCH, N. H., GLAGE, S., WEDEKIND, D., WEINSTEIN, E. J., CUI, X., et al. 2012. Zinc-finger nuclease mediated disruption of Rag1 in the LEW/Ztm rat. *BMC Immunol*, 13, 60.
- ZUO, Y., PERKINS, N. M., TRACEY, D. J. & GECZY, C. L. 2003. Inflammation and hyperalgesia induced by nerve injury in the rat: a key role of mast cells. *Pain*, 105, 467-79.
- ZYLKA, M. J., DONG, X., SOUTHWELL, A. L. & ANDERSON, D. J. 2003. Atypical expansion in mice of the sensory neuron-specific Mrg G protein-coupled receptor family. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 10043-8.

8 Anhang

Abbildungsverzeichnis

Abbildung 3.1:	Schematische Darstellung der Domänen eines GPCR.....	6
Abbildung 3.2:	Theoretische Konzentration-Wirkungskurven verschiedener Liganden ...	10
Abbildung 3.3:	Schematische Darstellung des G-Protein-Zyklus	12
Abbildung 3.4:	Schematische Darstellung von $G_{s/olf}$ - und $G_{i/o}$ -abhängiger Signaltransduktion	13
Abbildung 3.5:	Schematische Darstellung $G_{\alpha_{q/11}}$ - und $G_{\beta\gamma_{i/o}}$ -abhängiger Signaltransduktion.....	15
Abbildung 3.6:	Periphere und zentrale Modulation der Nozizeptoraktivität durch GPCR	19
Abbildung 3.7:	Phylogenetischer Baum der Mrg-Rezeptoren von Mensch, Maus und Ratte.....	28
Abbildung 3.8:	Schematische Darstellung der bislang bekannten hMrgX1-induzierten Signalwege.....	39
Abbildung 4.1:	Schematischer Aufbau des pcDNA4-HisMax-Vektors	49
Abbildung 4.2:	Schematischer Aufbau eines Reportergenvektors	53
Abbildung 4.3:	Prinzip des Nachweises der Liganden-induzierten Endozytose eines GPCR.....	66
Abbildung 4.4:	Exemplarische Fura2-Fluoreszenzmessungen	70
Abbildung 4.5:	Beispielhafte YFP- und Fura2-Fluoreszenz von TRPV1-YFP-exprimierenden F11-hMrgX1-Zellen	71
Abbildung 4.6:	Prinzip und exemplarisches Beispiel des Mn^{2+} -induzierten Fura2-Quenching	74
Abbildung 4.7:	Exemplarische Amplifikations- und Schmelzkurve bei der quantitativen PCR.....	80
Abbildung 4.8:	Übersicht über den Strahlengang im Durchflusszytometer	89
Abbildung 4.9:	Ereignisauswahl am Durchflusszytometer nach Größe und Granularität ..	90
Abbildung 4.10:	Unterscheidung von lebenden und toten Zellen im Durchflusszytometer .	91
Abbildung 5.1:	Oberflächenexpression von Xpress-Epitop-Rezeptor-Fusionsproteinen in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen .	94
Abbildung 5.2:	BAM8-22-vermittelte Ca^{2+} -Mobilisation in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen	95
Abbildung 5.3:	Ca^{2+} -Signale in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen (Fura2)	96
Abbildung 5.4:	Ca^{2+} -Konzentration-Wirkungskurven in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen (Fura2)	97

Anhang

Abbildung 5.5:	Ca ²⁺ -Signale in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Ae-Zellklonen (Aequorin)	100
Abbildung 5.6:	Ca ²⁺ -Konzentration-Wirkungskurven in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Ae-Zellklonen (Aequorin)	101
Abbildung 5.7:	Erk-1/2-Phosphorylierung in hMrgX1/MrgC-Rezeptor stabil-exprimierenden HEK293-Zellklonen	103
Abbildung 5.8:	Oberflächenexpression von Xpress-Epitop-hMrgX1-Fusionsproteinen in F11-hMrgX1-Zellen	104
Abbildung 5.9:	Ca ²⁺ -Mobilisation in F11- und F11-hMrgX1-Zellen	105
Abbildung 5.10:	BAM8-22-selektive Ca ²⁺ -Mobilisation in F11-hMrgX1-Zellen	106
Abbildung 5.11:	BAM8-22-induzierte Ca ²⁺ -Mobilisation in F11-hMrgX1-Zellen in Anwesenheit MrgC-spezifischer Liganden	107
Abbildung 5.12:	Liganden-induzierte Ca ²⁺ -Mobilisation in F11-Zellen nach transienter Expression von hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren	108
Abbildung 5.13:	Ca ²⁺ -Signale in HEK293-hMrgX1- und -mMrgC-Zellen nach Vorstimulation mit BAM8-22	110
Abbildung 5.14:	BAM8-22-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in HEK293-mMrgC- und -hMrgX1-Zellen	111
Abbildung 5.15:	Liganden-induzierte Rezeptorendozytose in HEK293-mMrgC- und -hMrgX1-Zellen	112
Abbildung 5.16:	Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in HEK293-Zellen nach transienter Expression von mMrgC- oder hMrgX1-Rezeptoren	113
Abbildung 5.17:	Liganden-induzierte Rezeptorendozytose in HEK293-rMrgC-Zellen	114
Abbildung 5.18:	BAM8-22-induzierte Rezeptorendozytose in F11-hMrgX1-Zellen	115
Abbildung 5.19:	Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in F11-Zellen nach transienter Expression von hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren	116
Abbildung 5.20:	Liganden-induzierte Veränderung der Oberflächen-Rezeptoren in ND-C-Zellen nach transienter Expression von hMrgX1-, mMrgC- oder rMrgC-Rezeptoren	117
Abbildung 5.21:	BAM8-22-induzierte Rezeptorendozytose in COS7-Zellen nach transienter Expression von hMrgX1- oder mMrgC-Rezeptoren	119
Abbildung 5.22:	Charakterisierung der HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zelllinie	121
Abbildung 5.23:	BAM8-22-vermittelte Ca ²⁺ -Signale in HEK293-hMrgX1- und HEK293-hMrgX1/TRPV1-Zellen	122
Abbildung 5.24:	TRPV1-Agonisten-vermittelte Ca ²⁺ -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen	124
Abbildung 5.25:	Sensitisierung des TRPV1 für CAP durch Bradykinin	126
Abbildung 5.26:	Sensitisierung des TRPV1 für CAP, Protonen und Temperatur durch BAM8-22	128
Abbildung 5.27:	Keine Sensitisierung des TRPV1-S502A oder -S800A durch BAM8-22	129

Abbildung 5.28:	Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor (Fura2-Quenching)	130
Abbildung 5.29:	PKC-unabhängige hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung (Fura2-Quenching)	131
Abbildung 5.30:	Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor (Ca ²⁺ -Imaging)	132
Abbildung 5.31:	PKC-unabhängige hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung (Ca ²⁺ -Imaging)	133
Abbildung 5.32:	TRPV1-Ströme in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen nach Stimulation mit CAP	135
Abbildung 5.33:	Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den hMrgX1-Rezeptor (Elektrophysiologie)	136
Abbildung 5.34:	PKC-unabhängige hMrgX1-vermittelte TRPV1-Aktivierung (Elektrophysiologie)	137
Abbildung 5.35:	Lipoxygenase-unabhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung	138
Abbildung 5.36:	Src-, PI3K-, Erk-1/2-, PKD- und G _{βγ} -unabhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung	139
Abbildung 5.37:	PLC-β-abhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung	141
Abbildung 5.38:	Ca ²⁺ -unabhängige hMrgX1-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung	142
Abbildung 5.39:	OAG-induzierte Ca ²⁺ -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen	143
Abbildung 5.40:	PMA- und OAG-induzierte Ca ²⁺ -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen	144
Abbildung 5.41:	DAG-Akkumulation-induzierte Ca ²⁺ -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Zellen	145
Abbildung 5.42:	Restriktionsanalyse des pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-YFP-Vektors	145
Abbildung 5.43:	DAG-vermittelte TRPV1-Aktivierung über die CAP-Bindestelle Tyrosin 511	147
Abbildung 5.44:	Aktivierung der TRPV1-Y511A-Mutante durch den hMrgX1-Rezeptor	148
Abbildung 5.45:	Restriktionsanalyse des pcDNA3.1-TRPV1-δ777-820-YFP-Vektors	149
Abbildung 5.46:	CAP-induzierte und basale Aktivierung der TRPV1-δ777-820-Mutante	150
Abbildung 5.47:	Aktivierung der TRPV1-δ777-820-Mutante durch den hMrgX1-Rezeptor	151
Abbildung 5.48:	Restriktionsanalyse des pcDNA3.1-TRPV1-Y511A-δ777-820-YFP-Vektors	152
Abbildung 5.49:	CAP-induzierte Ca ²⁺ -Signale in F11-hMrgX1/TRPV1-Y511A-δ777-820-Zellen	152
Abbildung 5.50:	Keine Aktivierung der TRPV1-Y511A-δ777-820-Mutante durch den hMrgX1-Rezeptor	153
Abbildung 5.51:	Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten Regulation der TRPV1-Funktion	154

Anhang

Abbildung 5.52:	Direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R.....	155
Abbildung 5.53:	PKC-abhängige direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R	156
Abbildung 5.54:	Lipoxygenase-abhängige direkte Aktivierung des TRPV1 durch den B2R	156
Abbildung 5.55:	B2R-vermittelte direkte TRPV1-Aktivierung über PIP ₂ -Abbau und DAG-Produktion.....	157
Abbildung 5.56:	Erk-1/2-Aktivierung in HEK293-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22	161
Abbildung 5.57:	Erk-1/2-Aktivierung in F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22	162
Abbildung 5.58:	Keine hMrgX1-vermittelte Aktivierung des CREB-abhängigen Reportergenkonstruktes in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen.....	163
Abbildung 5.59:	hMrgX1-vermittelte Aktivierung des Fos-Luz-Vektors in HEK293-hMrgX1-Zellen.....	163
Abbildung 5.60:	hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 5xSRE-Luz-Vektors in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen über Erk-1/2	164
Abbildung 5.61:	ELK-1-Aktivierung in HEK293-hMrgX1- und F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22	165
Abbildung 5.62:	Induktion Srf-abhängiger Gene in F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22	167
Abbildung 5.63:	hMrgX1-vermittelte Induktion von c-Fos und EGR-1 in F11-hMrgX1-Zellen über Erk-1/2	168
Abbildung 5.64:	hMrgX1-vermittelte Induktion von EGR-1-Proteinen in F11-hMrgX1-Zellen.....	169
Abbildung 5.65:	BAM8-22-induzierte Ca ²⁺ -Signale in primären Spinalganglienneuronen.....	170
Abbildung 5.66:	hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 5xSRE-Luz-Vektors in primären Spinalganglienneuronen über Erk-1/2	171
Abbildung 5.67:	hMrgX1-vermittelte EGR-1-Induktion in primären Spinalganglienneuronen über Erk-1/2	171
Abbildung 5.68:	hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 4xNFAT-Re-Luz-Vektors in F11-hMrgX1-Zellen über Calcineurin.....	172
Abbildung 5.69:	Expression Calcineurin-abhängiger NFAT-Isoformen in F11-hMrgX1-Zellen.....	174
Abbildung 5.70:	Induktion NFAT-abhängiger Gene in F11-hMrgX1-Zellen durch BAM8-22	174
Abbildung 5.71:	hMrgX1-vermittelte IP3R-1-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen über NFAT	175
Abbildung 5.72:	hMrgX1-vermittelte CCR2-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen über NFAT	176
Abbildung 5.73:	hMrgX1-vermittelte CCR2-Proteinexpression in F11-hMrgX1-Zellen ..	177
Abbildung 5.74:	hMrgX1-induzierte CCL2-Sensitivität in F11-hMrgX1-Zellen (cAMP-Akkumulation).....	178

Anhang

Abbildung 5.75:	hMrgX1-induzierte CCL2-Sensitivität in F11-hMrgX1-Zellen (Erk-1/2-Phosphorylierung).....	179
Abbildung 5.76:	hMrgX1-vermittelte Aktivierung des 4xNFAT-Re-Luz-Vektors in primären Spinalganglienneuronen über Calcineurin	180
Abbildung 5.77:	hMrgX1-vermittelte CCR2-Induktion in primären Spinalganglienneuronen über NFAT	181
Abbildung 5.78:	Keine B2R-vermittelte CCR2-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen	182
Abbildung 5.79:	B2R-vermittelte Aktivierung des 4xNFAT-Re-Luz-Vektors und IP3R-1-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen über NFAT	183
Abbildung 5.80:	B2R-vermittelte Induktion von c-Fos und EGR-1 in F11-hMrgX1-Zellen	184
Abbildung 5.81:	Graphische Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten Genregulation	186
Abbildung 5.82:	Ca ²⁺ -Signale in LAD2-Zellen	187
Abbildung 5.83:	Keine hMrgX1-vermittelte CCL2-Induktion in F11-hMrgX1-Zellen	188
Abbildung 5.84:	hMrgX1-vermittelte Induktion der CCL2-Produktion in LAD2-Zellen..	189
Abbildung 5.85:	Zusammenfassende Darstellung der hMrgX1-vermittelten CCR2-Induktion in Spinalganglienneuronen und CCL2-Produktion in Mastzellen.....	190
Abbildung 6.1:	Zusammenfassende Darstellung hMrgX1-induzierter Signalwege	193
Abbildung 6.2:	Putative 3D-Struktur des FMRF-Amid-gebundenen mMrgC-Rezeptors aus Heo, 2007	197
Abbildung 6.3:	Abgleich der Proteinsequenz des hMrgX1- und mMrgC-Rezeptors	198

Tabellenverzeichnis

Tabelle 3.1:	Übersicht über die Klassifizierung von GPCR, deren Liganden und strukturelle Merkmale	7
Tabelle 3.2:	Auswertung der Konzentration-Wirkungskurven aus Abbildung 3.2.....	10
Tabelle 3.3:	Übersicht über die Potenz verschiedener Liganden von MrgC-Rezeptoren der Ratte und der Maus	30
Tabelle 3.4:	Überblick über die Subfamilie der humanen MrgX/SNSR-Rezeptoren	35
Tabelle 4.1:	Primer für die Subklonierung von Mrg-Rezeptoren in den pcDNA4-HisMax-Vektor.....	50
Tabelle 4.2:	Übersicht über TRPV1-Expressionskonstrukte	52
Tabelle 4.3:	Überblick über Reportergenkonstrukte und aktivierende Transkriptionsfaktoren	53
Tabelle 4.4:	Überblick über stabil-exprimierende Zelllinien	58
Tabelle 4.5:	Übersicht über verwendete Restriktionsenzyme	62
Tabelle 5.1:	EC ₅₀ - und E _{max} -Werte aus den, in Abbildung 5.4 dargestellten Ca ²⁺ -Konzentration-Wirkungskurven	98
Tabelle 5.2:	EC ₅₀ - und E _{max} -Werte aus den, in Abbildung 5.6 dargestellten Ca ²⁺ -Konzentration-Wirkungskurven	102
Tabelle 5.3:	Src, PI3K, Erk-1/2, PKD und G _{βγ} -Komplexe vermitteln nicht die hMrgX1-induzierte TRPV1-Aktivierung.....	140
Tabelle 5.4:	Zusammenfassung der hMrgX1-vermittelten TRPV1-Aktivierung	154
Tabelle 5.5:	Zusammenfassender Vergleich der B2R- und hMrgX1-induzierten, TRPV1-aktivierenden Signalwege.....	158

Abkürzungsverzeichnis

12-HPETE	12-Hydroperoxy-eicosatetraensäure
AC	adenylate cyclase
AKAP	<i>A kinase anchoring protein</i>
AP-1	<i>activator protein 1</i>
APC	Allophycocyanin
AUC	<i>area under the curve</i>
B2R	Bradykinin-2-Rezeptor
BAM8-22	<i>bovine adrenal medulla 8-22</i>
BCTC	N-Butylphenyl-3-chloropyridin-tetrahydropyrazin-1-carboxamid
BDNF	<i>brain-derived neurotrophic factor</i>
BIM-X	Bisindolyl-maleimid 10
BSA	<i>bovine serum albumin</i>
C/EBP	<i>CCAAT/enhancer-binding protein</i>
CAP	Capsaizin
CCH	Carbachol
CCL2	<i>chemokine ligand 2</i>
CCR2	<i>chemokine receptor 2</i>
CGRP	<i>calcitonin gene-related peptide</i>
CNG	<i>cyclic nucleotide gated</i>
COX-2	Cyclooxygenase 2
CREB	<i>cAMP response element binding protein</i>
CsA	Cyclosporin A
DAG	Diacylglycerol
DMSO	Dimethyl-sulfoxid
Dyn-14	Dynorphin-14
EGFP	<i>enhanced GFP</i>
EGR-1	<i>early growth response protein 1</i>
ELISA	<i>enzyme-linked immunosorbent assay</i>
ELK-1	<i>E twenty-six-like transcription factor 1</i>
Epac	<i>exchange factor directly activated by cAMP</i>
Erk-1/2	<i>extracellular signal-regulated kinases 1/2</i>
FE	Flächeneinheit

Anhang

FSC	<i>forward scatter</i>
FSK	Forskolin
Fura2-AM	Fura2-acetoxymethyl ester
γ_2 -MSH	<i>γ_2-melanocyte stimulating hormone</i>
GAP	GTPase aktivierendes Protein
GDNF	<i>glial-derived neurotrophic factor</i>
GDP	Guaninnukleotiddiphosphat
GEF	<i>guanine nucleotide exchange factor</i>
GFP	<i>green fluorescent protein</i>
GIRK	<i>G protein-activated inward rectifying K⁺ channels</i>
GPCR	<i>G protein-coupled receptor</i>
GRK	G-Protein-gekoppelte Rezeptorkinase
HBS	HEPES-buffered saline
HEK	<i>human embryonic kidney</i>
hMrgX1	humaner MrgX1
HRP	<i>horseradish peroxidase</i>
IBMX	1-Isobutyl-1-methylxanthin
IEG	<i>immediate early gene</i>
IP ₃	Inositol-3,4,5-trisphosphat
IP ₃ R	IP ₃ -Rezeptor
IP3R-1	IP ₃ R-Isoform 1
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MKK1	<i>mitogen-activated protein kinase kinase 1</i>
mMrgC	muriner MrgC
Mrg	<i>Mas-related gene</i>
NDGA	<i>nordihydroguaiaretic acid</i>
NFAT	<i>nuclear factor of activated t cells</i>
NK1R	Neurokinin-1-Rezeptor
NMDA	N-Methyl-D-aspartat
OAG	Oleoyl-acetyl-glycerol
OD	optische Dichte
PBS	<i>phosphate-buffered saline</i>
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PI3K	Phosphoinositid-3-Kinase
PIP ₂	Phosphatidylinositol-3,4-bisphosphat
PKA	Proteinkinase A

Anhang

PKC	Proteinkinase C
PLC	Phospholipase C
PMA	Phorbol-myristyl-acetat
POMC	Proopiomelanocortin
PPAR	<i>peroxisome proliferator-activated receptor</i>
PTX	<i>Pertussis-Toxin</i>
RAVE	<i>receptor activity versus endocytosis</i>
RGS	<i>regulators of g protein signaling</i>
rMrgC	MrgC der Ratte
RT	Raumtemperatur
SCF	<i>stem cell factor</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
SP	<i>substance pain</i>
Src	Sarkoma-Kinase
SRE	<i>serum response element</i>
Srf	<i>serum response factor</i>
SSC	<i>sideward scatter</i>
STAT	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
TCF	<i>ternery complex factor</i>
TRPA1	<i>transient receptor potential cation channel ankyrin 1</i>
TRPV1	<i>transient receptor potential cation channel vanilloid 1</i>
WT	Wildtyp
YFP	<i>yellow fluorescent protein</i>

Aminosäurenverzeichnis

Aminosäure	Einbuchstaben-Code
Alanin	A
Arginin	R
Asparagin	N
Aspartat	D
Cystein	C
Glutamat	E
Glutamin	Q
Glycin	G
Histidin	H
Isoleucin	I
Leucin	L
Lysin	K
Methionin	M
Phenylalanin	F
Prolin	P
Serin	S
Threonin	T
Tryptophan	W
Tyrosin	Y
Valin	V

Verzeichnis von Primersequenzen für die quantitative PCR

Name	Accession- Nummer	Vorwärts-Primer	Rückwärts-Primer
c-Fos	NM_022197.2	gggacagcctttctactacc	gatctgcgcaaaagtcctgt
FosB	NM_001013146.1	acgccgagtcctactccag	tctctctctcttcgggagac
JunB	NM_021836.2	gggactgggagctcatacc	aaagggtggtgcatgtgg
Srf	NM_001109302.1	gcacagacctcacgcaga	atgtggccaccacagtt
Egr1	NM_012551.2	cgaacaaccctacgagcac	gcgccttctcgttattcaga
Egr2	NM_053633.1	ctaccgggtggaagacctc	aatgttgatcatgccatctcc
Egr3	NM_017086.1	caatctgtaccccgaggaga	ccgatgtccatcacattctct
Egr4	NM_019137.1	gccctcttcaacctcatgtct	ggggaaagggacatccag
Nur77	NM_024388.1	tgttgatgttctgcctttg	ggaggccatgtcgatcag
Ldb2	NM_001106009.1	cagtgtctgggaacacaacc	ttggctctcctaccaccatc
Crem2	NM_017334.1	ctgctttgccacaaggtgt	cgacattctttagcagcttcc
Crem3	NM_001110860.1	actagcacggggcaatacat	accatcagatcctgggtagaa
Npas4	NM_153626.1	agggtttgctgatgagttgc	tccccccaacttccattct
Cyr61	NM_031327.2	ggatctgtgaagtgcgtcct	ctgcatttcttgccttttt
Ctgf	NM_022266.2	gctgacctagaggaaacattaaga	ccggtaggtcttcacactgg
Bdnf	NM_012513.3	agcgcgaaatgtgttagtggt	gcaattgtttgcctctttttct
Ngf	M36589.1	tgcagtctcccacctctga	ccaggagggttcccaatatcc
Ccr2	NM_021866.1	aagaagtatccaagagcttgatgag	tcaccatcatcatagtcatacgg
Ip3r1	NM_001007235.1	catccagtatggcaacgtga	tcatggcgttcttctccagt
Cox2	NM_017232.3	tccaacctctctactacaccag	tccagaacttcttttgatcagg
Nfatc1	XM_001058445.1	tcaagattatgatgtcagtgagcag	tctctgggtgcggaaaggt
Nfatc2	NM_001107805.1	accagacttacctggatgacg	tgatttcgggaggagggt
Nfatc3	NM_001108447.1	tggtggccatcctgttgt	catctgtagattattggctttcac
Nfatc4	NM_001107264.1	cagagacaatgtgcctatccag	gtctcgccaatgatctcac
Ccl2	NM_031530.1	agcatccacgtgctgtctc	gatcatcttgcagtgatgag
β-Aktin	nm_031144.2	ggctcctagcaccatgaaga	atctgctggaaggtggacag

Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei Herrn Prof. Dr. Thomas Gudermann bedanken, dass ich am Walther-Straub-Institut der LMU München meine Doktorarbeit anfertigen konnte.

Bei meiner Doktormutter Prof. Dr. Ingrid Boekhoff möchte ich mich herzlichst bedanken: Vielen Dank Ingrid für deine Betreuung und die Hilfe beim „Auf’s-Dach-Steigen“.

Ich bedanke mich im Voraus ebenso ganz herzlich bei den weiteren Gutachtern meiner Arbeit für die Mühe bei der Begutachtung.

Ganz herzlich bedanke ich mich bei Dr. Andreas Breit für die außerordentliche Unterstützung im Institut und darum herum, für jede Menge zielführende oder ziellose Diskussionen, für den FluoStar, für die Patriots und die Anrufe bei Giselle, für’s Grillen und für die ziemlich gute Flasche Bordeaux bzw. Barolo.

Ein riesiges Dankeschön an die beste Kollegin der Welt: Ellen. Wir hatten es wirklich schön im Keller, wir wussten immer was der/die andere gerade macht, haben gemeinsam gegessen, getrunken, gesungen und gefeiert, uns mit diesem und jenem herum geärgert, haben geputzt (immer wieder Freitags), haben verschmutzt („quick and dirty“) und haben gegrillt (wo auch immer). Danke für die Unterstützung und Hilfe. Ohne dich hätte das alles wohl eher nicht so funktioniert.

Ein großes Dankeschön geht an Kathrin, Steffi und Ute. Danke Kathrin, dass du mich wieder zum VoBa gebracht hast, für Hilfe bei der qPCR und im Isotopenlab. Danke Steffi für die lange gemeinsame Zeit im Dunkeln, für wunderbare Gespräche am späten Abend und für die griechische Seite des Lebens. Danke Ute für jede Menge Hilfe im täglichen Laborleben, vor allem beim Blotten, bei der Kernaufreinigung, am FluoStar und für die Wandervorschläge.

Ich möchte mich ganz herzlich bei Dorke, Heike, Andrea, Lilli, Nele und Steffi bedanken. Danke Dorke für die Hilfe mit Word und der PCR und natürlich für jeden einzelnen Kuchen. Danke Heike für viele fruchtbare Diskussionen, dein Interesse, den BAMOG-Versuch und den Sonnenaufgang im Zug. Danke Andrea für deine anhaltend gute Laune, den Tag der Jogginghose und vieles andere mehr. Danke Lilli, in erster Linie für Wolle, aber auch für den ganz normalen Wahnsinn. Danke Nele für die Arbeit an der Bakterienfront, für’s Kaffeekochen, für das etwas andere Röstaroma und für’s Boarden/Skifahren (by the way: auch ein großer Dank an Wörn für glänzende Aussichten in unserem Wohnzimmer). Danke Steffi, vor allem für Hilfe bei der qPCR, Partys und gemeinsame Konferenzbesuche.

Ich möchte mich auch bei allen anderen ehemaligen und jetzigen Mitarbeitern des Walther-Straub-Instituts bedanken. Beispielsweise bei Susanna für die Hilfe mit dem Patchen, bei Harald für Ouzo, den Einsatz auf jeder Institutsfeier und ständig gute Laune und bei Heinz für viele

Anhang

kleine und große Hilfsaktionen (ob es um ein neues Fahrrad oder den Stickstoff ging, du hattest immer eine gute Idee!).

Ein großer Dank geht auch an meinen kleinen Bruder Stefan (meinen ersten Spielkameraden!). Du hast mich auch aus Berlin immer unterstützt!

Mama und Papa, euch auch vielen Dank dafür, dass ihr mir alles ermöglicht habt. Seit ich denken kann habt ihr mich immer unterstützt und mir bei allem geholfen, was ich begonnen habe. Ohne euch wäre ich nicht hier.

Schließlich danke ich meiner Frau Franzi. Dankeschön für deine Liebe, danke für die Zeit in München, danke fürs Zuhören und danke für die vielen Ratschläge. DANKE.

